



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**EXPRESIÓN EXÓGENA DE TELOMERASA HUMANA  
(hTERT) EN CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES  
DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO HUMANO (A-MSC)  
COMO UNA ESTRATEGIA PARA LA OBTENCIÓN DE  
LINEAS CELULARES.**

**MAIKEL ANDRES ALVAREZ SANCHEZ**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina  
Departamento de Ciencias Fisiológicas  
Maestría en Fisiología  
Bogotá  
2019



**EXPRESIÓN EXÓGENA DE TELOMERASA HUMANA (hTERT) EN  
CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO  
ADIPOSO HUMANO (A-MSC) COMO UNA ESTRATEGIA PARA LA  
OBTENCIÓN DE LINEAS CELULARES.**

**MAIKEL ANDRES ALVAREZ SANCHEZ**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Fisiología**

Director:

Ph.D. Orlando Chaparro Garzón

Línea de Investigación:

Fisiología celular

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Biología de Células Madre

GIBCM

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina  
Departamento de Ciencias Fisiológicas  
Maestría en Fisiología  
Bogotá  
2019



*“Los malos tiempos tienen un gran valor científico. Estas son ocasiones que un buen aprendiz no dejaría pasar ” - Ralph Waldo Emerson.*

*A mi Madre que es mi motor de vida, la razón de moverme  
hacia adelante.*

*A mi padre por su apoyo, su amor y por velar por mi  
bienestar estos años.*

*A mis hermanas Yenny y Yessica, por su apoyo incondicional  
y por soportar mi carácter estos años.*

*A mi sobrino Francisco, por ser una nueva razón para  
continuar esforzándome.*

*A mis angelitos motosos, que siempre llevo en mis  
pensamientos y en mi corazón.*

*Sin ustedes no habría logrado nada de esto*

*Los amo.*



## **Agradecimientos**

A la División de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia, por la financiación otorgada al proyecto.

A la Maestría en Fisiología, por apoyarnos financieramente y permitirnos la adquisición de materiales y reactivos necesarios para el desarrollo de este proyecto.

A la Dirección Académica, ya que haber tenido la beca de Asistente Docente me permitió culminar con éxito todo este proceso de la maestría y mejorar en la labor docente.

Al profesor Orlando Chaparro Garzón, por acogerme en el grupo de investigación GIBCM, por su orientación, apoyo y guía durante este importante proceso, por su paciencia y comprensión durante los diferentes obstáculos que se presentaron.

Al profesor Mauricio Bernal, por su apoyo, ayuda y paciencia durante estos años, nada de esto se hubiera podido realizar sin su ayuda, gracias por las enseñanzas, el apoyo y el tiempo invertido en enseñarme.

Al profesor Arturo Londoño del Instituto Curie en Francia, por la donación de los plásmidos, indispensables para el desarrollo de este trabajo.

A Elga, por su ayuda durante este proyecto, gracias por las palabras de aliento y lo caminado juntos, su apoyo fue indispensable.

A la profesora Zulma, por sus enseñanzas, sus palabras de aliento y por permitirme crecer como persona y profesional tanto en sus clases como en su club de revistas.

A los docentes de la Maestría en Fisiología, principalmente a los profesores Miguel Martínez y Jairo Zuluaga, por sus enseñanzas, amistad y paciencia durante estos años.

A Rocío, por su apoyo en el laboratorio y sus palabras de aliento cada vez que en este camino sentí que no daba más.

A Dianita y Adelaida, por su ayuda en todos los procesos relacionados con este proyecto, además de siempre recibirme con una sonrisa.

A Yolanda Cárdenas por su apoyo en el laboratorio de equipos comunes, por su paciencia, su amistad y ayuda en cada paso.

A Yolanda Buitrago de Biotecnología por aguantarme y apoyarme durante mi estancia y el desarrollo de los proyectos en el laboratorio de microbiología del IBUN.

Al grupo de bioprospección y bioprocesos del Instituto de Biotecnología por acogerme de una forma tan amena y por permitirme ser parte del laboratorio.

A Yolanda Pardo, del laboratorio de genética del Departamento de Biología, por su apoyo durante mi estancia allí como asistente docente, por su amistad y sus palabras de aliento.

A los profesores Luis Fernando Garcia, Camilo Lopez, Clara Bermudez y Felipe Sarmiento por su apoyo y enseñanzas durante mi labor como asistente docente y por permitirme crecer en esta importante labor.

A Mireya, Rita, Blanca y Luz Marina por todo el cariño que me regalaron mientras estuve en el Instituto de Genética, por sus palabras, su apoyo y su amistad, por la risas.

Al profesor Juan Jose Yunis porque fue quien sembró en mí el amor por la investigación y me construyó desde el pregrado, parte esencial en todo este proceso.



A Juan Manuel, por ser mi confidente y compañero durante estos años, por su amor, su amistad, su apoyo incondicional y su paciencia, por su compañía esas noches donde dejaba de dormir para estar conmigo, esas tardes donde prefería tomarse un café a mi lado aun con mi cara de fastidio antes que dejarme solo, gracias ya que parte de todos estos logros son también de él, por permitirme haber crecido tanto durante el tiempo que la vida nos unió.

A March, Yeya, Luisa, Jorgin (Potter), Ka, Yeya, Yuliana, Camilo Suarez, Camilo Barrios, Moni, Andrés Uribe, Miguelin, Elga y a quienes no nombro por el espacio, por aguantarme estos años las quejadas, las lloradas, las alegrías, las tragas malucas, las tusas y las llegadas sorpresa a sus casas a la madrugada, por todo el apoyo y el cariño que necesité siempre para lograr esta meta. Ustedes me han apoyado siempre y han sido voces de aliento y felicidad en todos los momentos duros que pasé durante la maestría. Los amo, y les agradezco por todo desde lo más profundo de mi corazón.

Finalmente a todos mis amigos, uno de los más grandes motores de mi vida, quienes me han apoyado durante todo este camino y quienes más facetas mías han soportado, saben que todo este camino fue más fácil de llevar gracias a ustedes.



## Resumen

Las células madre mesenquimales (MSCs) son células multipotenciales de tipo adulto localizadas en múltiples tejidos como el adiposo y la médula ósea. Se ha demostrado ampliamente su utilidad en la terapia celular y medicina regenerativa. Una de las alternativas más prometedoras en este campo es el uso de los factores paracrinos secretados por las células madre, conocidos como secretoma, los cuales estimulan la regeneración celular y la angiogénesis y disminuyen la inflamación y otros mecanismos como la apoptosis. Los cultivos primarios de las células mesenquimales se ven marcados principalmente por la limitada esperanza de vida, la variabilidad fenotípica dependiente del donante y de los métodos de obtención y cultivo, el desarrollo de senescencia después de 20 - 30 duplicaciones de la población y cambios en la expresión genética con disminución en la tasa de proliferación a medida que se aumentan los subcultivos, por lo que el secretoma obtenido a partir de estos puede presentar variabilidad e implica obtención constante de muestras y la renovación periódica del cultivo primario. Una estrategia para algunos de estos problemas es la generación de líneas celulares de las MSCs. En este trabajo se generó la expresión exógena de telomerasa humana (hTERT) a partir de una transducción lentiviral como estrategia para prolongar la esperanza de vida celular y establecer líneas celulares de A-MSC, sin embargo se observó que las células no logran immortalizarse con este proceso y que adicional su ciclo celular se vio afectado por la expresión de hTERT, causando la detención de la proliferación incluso en pases tempranos, se propone entonces la utilización de oncogenes para la immortalización que permitan la regulación del ciclo celular, para así mitigar el efecto deletéreo de la telomerasa en las células.

**Palabras clave:** Líneas celulares, células madre mesenquimales, tejido adiposo, telomerasa humana.

## Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotential adult cells located in multiple tissues such as adipose and bone marrow. Its utility in cell therapy and regenerative medicine has been widely demonstrated. One of the most promising alternatives in this field is the use of paracrine factors secreted by stem cells, known as secretome, which stimulate cell regeneration, angiogenesis and decrease inflammation and other mechanisms of the body such as apoptosis. Primary cultures of mesenchymal cells are delimited mainly by limited lifespan, donor-dependent phenotype variability, development of senescence after 20-30 population doublings and changes in gene expression with decrease in the rate of proliferation as the subcultures are increased, so that the secretoma obtained can present variability and involve constant collection of samples and periodic renewal of the primary culture. An used strategy for solve these troubles is the generation of cell lines of A-MSCs. In this research an exogenous expression of human telomerase (hTERT) was generated from a lentiviral transduction as a strategy to prolong the cellular lifespan and establish cell lines, however it is seem that wasn't possible to immortalize the cells with this process and that additional its cell cycle is affected by the expression of hTERT, causing the stop of proliferation even in early passages, then the use of oncogenes for immortalization is proposed, which allows regulation of the cell cycle, in order to mitigate the deleterious effect of telomerase in this cells.

**Keywords:** Cell lines, mesenchymal stem cells, adipose tissue, human telomerase.

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen.....</b>	<b>XI</b>
<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>XV</b>
<b>Lista de Tablas .....</b>	<b>XVI</b>
<b>Lista de Símbolos y Abreviaturas.....</b>	<b>XVII</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Objetivos.....</b>	<b>5</b>
1.1.    Objetivo general .....	5
1.2.    Objetivos específicos.....	5
1.2.1.    Obtener y caracterizar cultivos primarios de A-MSCs, respecto a su capacidad de diferenciación multilínea, expresión de marcadores de superficie y capacidad de adherencia al plato.....	5
1.2.2.    Obtener células A-MSCs que presenten expresión exógena de hTERT. ....	5
1.2.3.    Evaluar las diferentes A-MSCs transducidas respecto a su establecimiento como líneas celulares. ....	5
<b>2. Marco Teórico.....</b>	<b>6</b>
2.1.    Células Madre.....	6
2.1.1.    Definición y características. ....	6
2.1.2.    Clasificación de las células madre.....	6
2.2.    Células Madre Mesenquimales.....	7
2.2.1.    Definición .....	7
2.2.2.    Características.....	7
2.3.    Señalización paracrina de las MSCs.....	9
2.3.1.    Medios condicionados y regeneración tisular. ....	10
2.4.    Inmortalización celular .....	11
2.4.1.    Ciclo celular y Senescencia. ....	11
2.4.2.    Métodos de Inmortalización. ....	18
2.4.3.    Inmortalización de MSCs mediante expresión exógena de hTERT.....	20
<b>3. METODOLOGÍA.....</b>	<b>23</b>
3.1.    Cultivo primario de A-MSCs. ....	23

3.2.	Evaluación fenotípica de las A-MSCs.....	24
3.3.	Ensayos de diferenciación celular. ....	24
3.3.1.	Diferenciación adipogénica .....	24
3.3.2.	Diferenciación osteogénica.....	25
3.3.3.	Diferenciación condrogénica .....	25
3.4.	Transducción lentiviral. ....	26
3.4.1.	Plásmidos.....	26
3.4.2.	Transformación de <i>Escherichia coli</i> con plásmidos de interés. ....	27
3.4.3.	Extracción y purificación de plásmidos.....	29
3.4.4.	Producción del lentivirus con el constructo hTERT-GFP.....	30
3.4.5.	Transducción de A-MSCs e inmortalización.....	32
3.4.6.	Transducción de A-MSCs e inmortalización con lentivirus comercial. ....	33
3.5.	Cultivo y expansión de líneas.....	33
3.6.	Evaluación de la transducción celular. ....	34
3.6.1.	Evaluación de plásmidos .....	34
3.6.2.	Evaluación de la transducción por fluorescencia .....	34
3.6.3.	Selección de células GFP+ mediante sorting por citometría de flujo. ..	34
3.6.4.	Evaluación de la transducción mediante el cultivo con puromicina. ....	35
3.6.5.	Evaluación mediante inmunofluorescencia.....	35
3.6.6.	Ensayo de agar.....	36
<b>4.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>36</b>
4.1.	Cultivos primarios de A-MSCs. ....	36
4.2.	Evaluación de la transducción celular. ....	41
4.2.1.	Evaluación de plásmidos .....	42
4.2.2.	Evaluación de la transducción con el lentivirus hTERT-GFP.....	43
4.2.3.	Selección de células GFP+ de los lotes transducidos con el constructo hTERT-GFP mediante sorting. ....	45
4.2.4.	Evaluación de la transducción con el lentivirus hTERT-puro-GFP. ....	48
4.2.5.	Expresión exógena de los genes. ....	53
4.3.	Ensayos de Soft Agar. ....	54
<b>5.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>56</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>65</b>
<b>7.</b>	<b>Perspectivas y recomendaciones.....</b>	<b>66</b>
7.1.	Perspectivas .....	66
7.2.	Recomendaciones .....	67
<b>8.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>68</b>
<b>A.</b>	<b>Anexo: Consentimiento informado utilizado en el proyecto. ....</b>	<b>79</b>

## Lista de Figuras

Pág.

<b>Figura 1. Estructura del telomero (Calado &amp; Young, 2009).....</b>	<b>15</b>
<b>Figura 2. El complejo de la telomerasa humana y sus componentes. (Calado &amp; Young, 2009)17</b>	<b>17</b>
<b>Figura 3. Efecto de la telomerasa en el acortamiento de los telomeros. (Brazvan et al., 2018) 18</b>	<b>18</b>
<b>Figura 4. Caracterización inmunofenotípica de ADS EX13.....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 5. Caracterización inmunofenotípica de ADS EX12.....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 6. Caracterización Inmunofenotípica de ADSEX15.....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 7. Tinción Red Oil de la diferenciación adipogénica de las A-MSCs. ....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 8 Tinción Alizarin Red de la diferenciación osteogénica de las A-MSCs. ....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 9. Tinción Alcian Blue de la diferenciación condrogénica de las A-MSCs.....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 10. Electroforesis de los plásmidos de interés.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 11. Evaluación por microscopia de fluorescencia de la expresión de GFP en células transducidas.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 12. Formación de esferoides por las A-MSCs posterior a la transducción.....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 13. Evaluación por fluorescencia de los esferoides formados por las A-MSCs transducidas.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 14. Selección de poblaciones GFP + de A-MSCs. A (Control) B (ADS-EX12) C (ADSEX-13) .....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 15. Caracterización por citometría del sorting celular A la izquierda ADSEX-12 y a la derecha ADSEX-13.....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 16. Evaluación de las poblaciones seleccionadas por sorting celular para GFP+ mediante fluorescencia.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 17. Evaluación del sorting por fluorescencia GFP+, 2 semanas posterior a la selección. ....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 18. Transducción de ADSEX15 con el lentivirus del constructo hTERT-puro-GFP ..</b>	<b>49</b>
<b>Figura 19. Selección 24 horas por puromicina de células ADSEX15 transducidas con el constructo hTERT-puro-GFP.....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 20. Selección 72 horas por puromicina de celulas ADSEX15 transducidas con el constructo hTERT-puro-GFP.....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 21. Selección 120 horas por puromicina de celulas ADSEX15 transducidas con el constructo hTERT-puro-GFP.....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 22. Evaluación por inmunofluorescencia hTERT y GFP de ADS-EX12 y ADS-EX13 .....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 23. Evaluación macroscópica del Ensayo de Soft Agar de las A-MSCs transducidas. ....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 24. Evaluación microscópica del Ensayo de Agar de las A-MSCs transducidas. ....</b>	<b>55</b>

## Lista de Tablas

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Líneas celulares obtenidas a través de la expresión exógena de telomerasa humana hTERT.....	22
<b>Tabla 2.</b> Líneas celulares obtenidas a través de la expresión exógena de telomerasa humana hTERT acoplada al uso de oncogenes.....	22
<b>Tabla 3.</b> Anticuerpos monoclonales para inmunofenotipificación por citometría de flujo. .....	24
<b>Tabla 4.</b> Lotes celulares A-MSC utilizados en los procesos de transducción.....	37
<b>Tabla 5.</b> Concentración de plásmidos posterior a la extracción.....	42



## Lista de Símbolos y Abreviaturas

### Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>A-MSCs</i>	Células Madre Mesenquimales derivadas de Tejido Adiposo.
<i>hTERT</i>	Telomerasa Humana
<i>hPL</i>	Lisado Plaquetario Humano
<i>GFP</i>	Proteína verde fluorescente
<i>GIBCM</i>	Grupo de Investigación en Biología de Células Madre
<i>hMSCs</i>	Células Madre Mesenquimales Humanas
<i>hAmnio-MSCs</i>	Células Madre Mesenquimales derivadas de Tejido Amniótico
<i>MSC</i>	Células Madre Mesenquimales
<i>BM-MSCs</i>	Células Madre Mesenquimales derivadas de Medula Ósea
<i>MCs</i>	Medios condicionados



## Introducción

Las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (A-MSCs) han sido usadas ampliamente en los campos de la medicina regenerativa y la terapia celular. Se ha logrado demostrar como su uso permite la mejoría importante en los procesos de regeneración tisular. De forma importante el Grupo de Investigación en Biología de Células Madre (GIBCM) ha encontrado que el uso de los factores paracrinos secretados por estas tiene el mismo efecto en regeneración tisular que su uso directo. Estos factores paracrinos, conocidos también como secretoma, estimulan la regeneración celular y la angiogénesis y disminuyen la inflamación y otras respuestas como la apoptosis. La obtención de estos factores paracrinos en los medios de cultivo brinda la oportunidad de establecer medios condicionados, los cuales permiten el uso y la aplicabilidad en conjunto con el uso de vehículos como hidrogeles de colágeno y fibrina en tratamientos para promover la proliferación celular y la generación de nuevos vasos (angiogénesis) promoviendo la recuperación y curación de tejidos o células que han sido afectadas por alguna enfermedad. (Hom, D., 1999; Short B., 2003; Chaparro, 2006; Hong et al, 2006; Kapoor M. et al, 2007; Kim W-S et al, 2007, Chen, L et al, 2008).

Los cultivos primarios de las células mesenquimales se ven marcados principalmente por una limitada esperanza de vida, variabilidad fenotípica dependiente del donante y de los métodos de obtención y cultivo, el desarrollo de senescencia después de 20 - 30 duplicaciones de la población (pasajes) y cambios en la expresión genética con disminución en la tasa de proliferación a medida que se aumentan los subcultivos, esto implica variaciones asociadas a la activación de señales de senescencia por vías de señalización P53 o P16 llevan a la modificación en la expresión genética que genera un fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP), que puede entonces variar la expresión de los factores

paracrinos e incluso incluir en estos factores asociados a senescencia que puedan estimular este efecto de forma paracrina, este fenotipo senescente temporalmente entra en procesos de envejecimiento y lleva a la muerte de las poblaciones celulares, implicando entonces la obtención de nuevas muestras y nuevos lotes celulares, y por lo tanto los medios condicionados obtenidos a partir de estos celulares pueden presentar variabilidad dependiente de los donantes, e implican la obtención constante de muestras y la renovación periódica de los cultivos primarios, llevando a un aumento en los costos de producción e investigación de los medios condicionados además de la disminución en la homogeneidad de los mismos (L Balducci, Saldarelli, & Alessandri, 2015; Luigi Balducci et al., 2014; Chen et al., 2011).

El uso de los medios condicionados en las investigaciones, tratamientos y aplicaciones futuras llevadas a cabo por el grupo de investigación GIBCM y colaboradores necesitan de la obtención consistente y periódica de cultivos celulares, que se ven afectados por las características anteriormente descritas. Adicional a esto es necesaria la validación de cada uno de los diferentes cultivos primarios obtenidos, para verificar que presente las características propias de las A-MSCs y de sus efectos paracrinos, lo que implica un alto costo. Es importante entonces llevar a cabo estrategias que permiten la obtención consistente de medios condicionados más homogéneos, disminuyendo las dificultades y retos de la renovación constante de cultivos primarios de A-MSCs que establece la senescencia celular de estas poblaciones (Cho et al., 2012; Doncel Pacheco & Chaparro Garzón, 2010; Escobar & Chaparro, 2016; He, Cai, Luo, & Liu, 2015; S. C. Lee, Jeong, Lee, & Kim, 2016; I. Linero & Chaparro, 2014; Núñez Ríos, Chaparro Garzón, Gómez Bello, & Muñoz, 2010; Rathinasabapathy et al., 2016; Sánchez Cuervo & Chaparro Garzón, 2011).

Una de las soluciones ampliamente desarrolladas en este campo, es la inmortalización celular y la generación de líneas capaces de mantener las características principales de las poblaciones celulares, en el caso de las MSCs se deben conservar características tales como su capacidad de adherencia al plato de cultivo, su multipotencialidad, y la expresión positiva de marcadores de superficie CD73, CD90, CD105 y HLA-DR y negativa para CD14 y CD45. El proceso de inmortalización celular confiere a células normales cultivadas in vitro

un aumento en la esperanza de vida, a partir de mutaciones espontaneas, exposición a carcinógenos o modificación de genes relacionados con el ciclo celular, permitiendo de esta forma mantener un cultivo consistente y con mayor esperanza de vida que mantenga las características fenotípicas y moleculares de las A-MSCs de cultivo primario, evitando así el desarrollo de senescencia y la disminución en la tasa de proliferación a medida que se aumentan los subcultivos, de forma tal que no sea necesaria la obtención constante de muestras nuevas y la renovación periódica de los cultivos primarios (L Balducci et al., 2015; Luigi Balducci et al., 2014; Chen et al., 2011; Kant et al., 2018; T. M. Liu et al., 2013; Petkov, Kahland, Shomroni, & Lingner, 2018; Price & Figg, II, 2004).

Una de las estrategias para immortalizar las células y generar líneas a partir de estas es la modificación por sobreexpresión o silenciamiento de genes asociados al ciclo celular tales como la telomerasa humana (hTERT) o genes asociados al secuestro de proteínas tales como P53. Es importante resaltar que los trabajos desarrollados dentro del grupo GIBCM están encaminados a la obtención de medios condicionados bajo condiciones de cultivo Xeno-free, para finalmente llevarlos a la cotidianidad en su uso como una alternativa clínica para la medicina regenerativa, esto establece un reto al realizar modificaciones genéticas ya que es de preferencia evitar el uso de oncogenes, en respuesta a esto en este trabajo se llevó a cabo la generación de lotes celulares con expresión exógena de telomerasa humana (hTERT) mediante un proceso de transducción lentiviral, con la intención de immortalizarlos y generar líneas celulares de A-MSCs, esto ya que a pesar de que existen algunas líneas celulares desarrolladas e incluso una comercial, estas se han obtenido en condiciones de cultivo con agentes xenogénicos tales como el suero fetal bovino (SFB) que interfieren en la obtención de cultivos celulares Xeno-free y de las cuales no tenemos control sobre los procesos de immortalización realizados, por lo que establece la importancia de obtener líneas celulares propias obtenidas por expresión exógena de telomerasa humana bajo nuestras condiciones de cultivo.



# **1. Objetivos**

## **1.1. Objetivo general**

Evaluar las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo A-MSC que presenten expresión exógena de telomerasa humana (hTERT) como un posible modelo para la obtención de líneas celulares de A-MSCs.

## **1.2. Objetivos específicos.**

- 1.2.1. Obtener y caracterizar cultivos primarios de A-MSCs, respecto a su capacidad de diferenciación multilínea, expresión de marcadores de superficie y capacidad de adherencia al plato.
- 1.2.2. Obtener células A-MSCs que presenten expresión exógena de hTERT.
- 1.2.3. Evaluar las diferentes A-MSCs transducidas respecto a su establecimiento como líneas celulares.

## 2. Marco Teórico

### 2.1. Células Madre

#### 2.1.1. Definición y características.

Las células madre son células indiferenciadas que se caracterizan por tener capacidad de autorenovarse y diferenciarse a distintos linajes celulares específicos, procesos que están ligados, de tal forma que en el momento que hay un estímulo que implique la generación de nuevas células diferenciadas hay una división asimétrica en que una de las células resultantes conserva la capacidad de autorenovación y mantenerse indiferenciada mientras la otra entra a diferenciarse en un linaje especializado de células (Fortier, 2005; Inaba & Yamashita, 2012; Johal, Lees, & Reid, 2015; Ratajczak, 2014; Vats, Tolley, Polak, & Buttery, 2002).

#### 2.1.2. Clasificación de las células madre

Las células madre tienen una clasificación principal según su potencialidad que las divide en:

**Totipotentes:** Son aquellas células que tienen la capacidad de dar origen a un organismo completo, es decir de generar todos los tipos de células y tejidos, incluyendo tejido extraembrionario, y hace referencia a las células obtenidas del estado temprano del cigoto cuando la mórula tiene una división de 8 células.

**Pluripotentes:** Son las células que tienen la capacidad de diferenciarse a cualquiera de las tres capas embrionarias, pero no pueden generar tejido extraembrionario, obtenidas de la masa interna embrionaria del blastocito.

**Multipotentes:** Son aquellas células que únicamente pueden diferenciarse en células de su



misma capa embrionaria de origen, es decir únicamente se pueden diferenciar en mesodermo, endodermo o ectodermo.

Igualmente se pueden clasificar dependiendo su origen en células embrionarias o células adultas. Las células de tipo adulto son todas aquellas que se obtienen postnatalmente, es decir todas aquellas que no provienen de tejidos embrionarios, dentro de estas podemos encontrar las células madre hematopoyéticas y las células madre mesenquimales, que pueden hallarse en diferentes tejidos como la médula ósea, adiposo, pulpa dental, entre otros. Por su parte las células embrionarias son aquellas obtenidas del embrión, puntualmente de la masa interna del blastocito que está rodeado por el trofoblasto, por lo que su obtención representa una mayor dificultad (de Kretser, 2007; Fortier, 2005; Inaba & Yamashita, 2012; Ratajczak, 2014; Trosko, 2014).

## **2.2. Células Madre Mesenquimales**

### **2.2.1. Definición**

Las células madre mesenquimales (MSCs) son células multipotenciales de tipo adulto que se encuentran en los diferentes tejidos mesenquimales, que tienen la capacidad de diferenciarse a los tres linajes mesenquimales (adipogénico, osteogénico y condrogénico) y de autorenovarse. Fueron inicialmente aisladas de la médula ósea y posteriormente identificadas en diferentes tejidos adultos como adiposo, sinovial, muscular, pulmonar, pancreático, pulpa dental, ligamento periodontal, gingiva, gelatina y sangre de cordón umbilical, entre otros (L Balducci & Alessandri, 2016; Fortier, 2005; Hematti, Keating, & service, 2013; Inaba & Yamashita, 2012; Labusca, 2015; I. M. Linero, Doncel, & Chaparro, 2014; Panchalingam, Jung, Rosenberg, & Behie, 2015; Sart, Tsai, Li, & Ma, 2014; Wankhade, Shen, Kolhe, & Fulzele, 2016; Weyand et al., 2013).

### **2.2.2. Características**

---

Se ha descrito la obtención de las células madre mesenquimales (MSC) a partir de diferentes tejidos y fuentes como la sangre del cordón umbilical, el tejido adiposo, la sangre periférica, entre otras. Las MSC derivadas de placenta, han sido otro importante foco de estudio debido a su obtención no invasiva y a la alta presencia de estas en el tejido placentario. Estas células tienen la capacidad de diferenciarse en condiciones *in vitro* a los tres linajes mesenquimales y en linajes propios endodérmicos y ectodérmicos, además de una habilidad inmunomoduladora, lo cual las presenta como objetos de estudio y aplicación de gran importancia en las aplicaciones terapéuticas futuras (Alcayaga-Miranda, Varas-Godoy, & Khoury, 2016; Hematti et al., 2013; Labusca, 2015; Panchalingam et al., 2015; Weyand et al., 2013).

Las MSCs promueven la regeneración y reparación tisular, poseen capacidad inmunomoduladora y la habilidad de secretar moléculas bioactivas (efecto paracrino), lo cual les concede potencial terapéutico en el campo de la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos (Bajek et al., 2016; Labusca, 2015; I. Linero & Chaparro, 2014; I. M. Linero et al., 2014; Panchalingam et al., 2015; Uysal, Tobita, Hyakusoku, & Mizuno, 2012; J. Wang et al., 2012; Wankhade et al., 2016).

De acuerdo con la International Society for Cellular Therapy (ISCT), las MSCs se caracterizan por:

- 1) Capacidad de adherencia al plástico en platos de cultivo.
- 2) Presencia de un fenotipo celular con alta expresión de CD73, CD90 y CD105; variable de CD34 y negativa para CD14, CD45 y HLA-DR, idealmente determinado mediante citometría de flujo.
- 3) Capacidad de diferenciación *in vitro* a los linajes adipogénico, osteogénico y condrogénico.

Sin embargo, hoy en día se ha demostrado que también pueden diferenciarse a linajes no mesodérmicos como hepatocitos y glía (Escobar Caicedo & Chaparro Garzón, 2011; Fortier,

2005; Hematti et al., 2013; Johal et al., 2015; I. Linero & Chaparro, 2014; I. M. Linero et al., 2014; Panchalingam et al., 2015; Weyand et al., 2013).

Aunque las BM-MSCs y las A-MSCs tienen potenciales de proliferación y diferenciación similares, las primeras son escasas, aproximadamente 1/100.000 células de la médula ósea, mientras que las A-MSCs son el equivalente al 2% de las células nucleadas del tejido adiposo, tienen mayor estabilidad genética y morfológica, mayor tasa de proliferación con retención de su capacidad multilínea en los cultivos in vitro y son menos propensas a la senescencia (Doncel Pacheco & Chaparro Garzón, 2010; Escobar & Chaparro, 2016; Sánchez Cuervo & Chaparro Garzón, 2011).

Se puede encontrar en la página ClinicalTrials.org de los *National Institutes of Health (NIH)* de los Estados Unidos, que a la fecha se está dando el desarrollo de 898 ensayos clínicos relacionados con el uso de células madres mesenquimales, los cuales son de gran importancia para su uso en aplicaciones terapéuticas ( <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=mesenchymal+stem+cell&cntry=&state=&city=&dist=> Consulta: Noviembre 22 de 2018).

### **2.3. Señalización paracrina de las MSCs**

El efecto paracrino de las A-MSCs, producto de su capacidad de secreción de citoquinas pro y antiinflamatorias, quimoquinas, factores antiapoptóticos, neuroprotectores y angiogénicos al medio extracelular circundante, es considerado actualmente el principal mecanismo fisiológico para la promoción de la reparación tisular y la inmunomodulación (Bajek et al., 2016; Carceller, Guillen, Ferrandiz, & Alcaraz, 2015; Locke, Feisst, & Meidinger, 2015). Este conocimiento permitió el desarrollo de investigaciones que demostraron un nuevo paradigma: los medios condicionados (medios de cultivo ricos en sustancias secretadas por las A-MSCs) son capaces de reproducir los beneficios del trasplante celular (Cho et al., 2012; He et al., 2015; Kober et al., 2016; S. C. Lee et al., 2016; Rathinasabapathy et al.,

---

2016). Por esta razón, nuestro grupo de investigación constituyó una línea de trabajo para la producción, caracterización y empleo de medios condicionados (MCs) logrando la recuperación motora de lesiones medulares en ratas (Núñez, 2010), y la cicatrización de heridas cutáneas y regeneración ósea -en animales y humanos- de manera equiparable al trasplante celular (Henao, 2016; I. Linero, 2012; I. M. Linero et al., 2014), y con ventajas adicionales, como facilidad de preservación, almacenamiento y transporte (Alcayaga-Miranda et al., 2016; L Balducci et al., 2015; Chen et al., 2011; Cho et al., 2012; B. R. Zhou et al., 2013).

### **2.3.1. Medios condicionados y regeneración tisular.**

Los Medios condicionados son los medios en los que se cultivan las células y que son ricos en sustancias secretadas de manera paracrina por estas al cultivo, principalmente poseen citoquinas, quimoquinas y otros factores, que son responsables de actividades inmunomoduladoras y de inducción de la regeneración tisular. (Carceller et al., 2015; Doncel Pacheco & Chaparro Garzón, 2010; S. C. Lee et al., 2016; I. Linero & Chaparro, 2014; Núñez Ríos et al., 2010; B. R. Zhou et al., 2013).

El medio condicionado se puede obtener en diferentes pasajes, particularmente dentro del Grupo de Investigación de Biología de Células Madre se obtiene el medio condicionado proveniente de células de pasajes 1 a 7, donde se hace la recolección del medio de cultivo de 24 horas sin suplementos, se filtra y se caracteriza para una serie de factores angiogénicos, determinando entonces la presencia y la cantidad de las moléculas paracrinas en el medio (Doncel Pacheco & Chaparro Garzón, 2010; Escobar & Chaparro, 2016; Escobar Caicedo & Chaparro Garzón, 2011; I. Linero & Chaparro, 2014; Sánchez Cuervo & Chaparro Garzón, 2011).

Estos medios condicionados tienen una capacidad regenerativa comparable a la del trasplante celular mismo, se ha demostrado en varios estudios como estos medios

condicionados son de importancia en la terapia de diferentes patologías, permitiendo una adecuada reparación y regeneración de diferentes tejidos tales como óseo, nervioso, muscular, entre otros, e incluso permitiendo la recuperación funcional de órganos y tejidos (Alcayaga-Miranda et al., 2016; Cho et al., 2012; Kober et al., 2016; S. C. Lee et al., 2016; Núñez Ríos et al., 2010; Rathinasabapathy et al., 2016; Teixeira et al., 2017; B. R. Zhou et al., 2013). Se puede observar en la actualidad ampliamente el uso de medios condicionados en las investigaciones, los cuales se usan en diferentes formas, la principal es el uso de hidrogeles de colágeno y fibrina, que se pueden ubicar sobre el tejido lesionado para favorecer mediante la difusión de moléculas la reparación de fallas en tejidos como el óseo, nervioso, adipogénico, entre otros (Carceller et al., 2015; Kober et al., 2016; S. C. Lee et al., 2016; W. Y. wai Lee & Wang, 2017; Locke et al., 2015; Núñez Ríos et al., 2010; Rathinasabapathy et al., 2016; Sánchez Cuervo & Chaparro Garzón, 2011; Teixeira et al., 2017).

## **2.4. Inmortalización celular**

El concepto de inmortalización hace referencia a perpetuar la vida o la existencia de un organismo, en el caso puntual de las células hace referencia a un proceso en el que una célula, que normalmente entra en senescencia y muerte celular, tiene una modificación que puede ser natural o inducida de genes o vías de señalización relacionadas con el ciclo celular y que llevan a la prolongación de su esperanza de vida y por lo tanto la eliminación de los procesos de senescencia y muerte celular, particularmente de apoptosis, generando de esta forma lo que se conoce como línea celular. La generación de líneas celulares ha sido una herramienta ampliamente usada en la investigación en biología celular, medicina regenerativa, y oncología, entre otras (Luigi Balducci et al., 2014; Chen et al., 2011; Eid & Garcia, 2015; Garcia-Mesa et al., 2017; T. M. Liu et al., 2013; Stepanenko & Kavsan, 2012; Trosko, 2014).

### **2.4.1. Ciclo celular y Senescencia.**

---

El ciclo celular es el conjunto de procesos y mecanismos que llevan al crecimiento de la célula y su proceso de división y proliferación. Este proceso se da en todas las células eucariotas, está determinado por un programa de expresión genética que transcurre a través de unas fases puntuales y culmina en la división de las células. El control de este ciclo se da mediante la expresión de genes específicos, los cuales codifican para proteínas que controlan la progresión del ciclo celular o actúan en procesos metabólicos asociados a este, por lo que es importante denotar que la expresión de estas proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular debe darse durante intervalos específicos de tiempo en el transcurso del mismo (Rodriguez, Baltasar, & Reyes, 2004).

#### **2.4.1.1. Fases del ciclo celular.**

El ciclo celular se caracteriza principalmente por la división de una célula en dos, las cuales cuentan de igual manera con los elementos estructurales y funcionales suficientes para repetir el ciclo de crecimiento y división. Este proceso sucede de manera secuencial asegurando que las células resultado de la división sean idénticas, tanto genética, estructural y funcionalmente, a las células madre como entre sí (Díaz, Ortiz, Bretón, Gómez, & Mesa, 2003; Rodriguez et al., 2004).

El ciclo celular está dividido en cuatro fases que comprenden los procesos necesarios para llevar a cabo la culminación exitosa: Crecimiento 1 (G1), Interfase o síntesis de DNA (S), Crecimiento 2 (G2) y Mitosis (M). La fase G1, es la fase inicial de una célula proveniente de una división previa, en la cual la célula aumenta además de su tamaño, la transcripción y traducción garantizando la presencia de todas las proteínas y RNAs necesarios para la síntesis de nuevo DNA. La fase S, es en la que se desarrolla la síntesis de DNA, es decir hay un proceso de duplicación de la información genética, estableciendo que al finalizar esta etapa la célula posea el doble de la información genética normal, proceso primordial para garantizar la división equitativa de la información genética en las células resultantes del proceso de división futuro y la conservación de las características idénticas a las de la célula de origen. La fase G2 es la segunda fase de crecimiento celular, en la cual la célula continúa

el proceso de producción de proteínas y RNAs, además de orgánulos, para garantizar que después de la división las células resultantes sean autónomas para su supervivencia y sostenimiento metabólico. Por último la fase M es en la que se da el proceso de división nuclear y celular, esta fase está compuesta por diferentes etapas en las que los cromosomas se condensan, se separan, tienen procesos de recombinación y finalmente se forman dos células resultantes, cada una con la misma información metabólica y genética que la célula de origen. Es importante estipular que este ciclo celular tiene diferentes puntos de control en las fases, estos controles determinan que los procesos tales como la duplicación de DNA o la producción de proteínas se hayan dado efectivamente, o también tienen función de censurar el nicho celular, de modo tal que si hay algún error en el proceso o alguna señal intra o extracelular que determine que no se puede continuar con el proceso de división la célula debe entrar en una quinta fase conocida como G0, o fase de quiescencia, en esta fase la célula detiene completamente el ciclo y por lo tanto no hay crecimiento ni duplicación de la información genética, hasta evaluar si el error es reparable o no y si la célula puede retornar al ciclo celular normal, o si entra en procesos de senescencia celular y envejecimiento, lo cual puede durar largos periodos de tiempo (Díaz et al., 2003; T. M. Liu et al., 2013; Rodriguez et al., 2004; Sun, Coppé, & Lam, 2018).

#### **2.4.1.2. Senescencia**

Senescencia hace referencia al proceso mediante el cual las células detienen su proliferación, en el caso de los cultivos in vitro sucede después de varios pasajes. Al entrar en senescencia las células sufren de varias alteraciones relacionadas con la morfología, la expresión genética y la traducción y estabilidad de diferentes proteínas relacionadas con diferentes procesos metabólicos, incluyendo aquellas relacionadas con el ciclo celular. La etapa de senescencia celular puede ser desatada por diferentes factores tales como alteraciones en el DNA como mutaciones y alteraciones en la expresión de genes o proteínas relacionadas con el control del ciclo celular, entre otras, pero de manera importante se resalta la senescencia replicativa estimulada por el acortamiento de los telómeros. Este proceso acoplado a otros factores como el estrés oxidativo generalmente juegan un papel importante

en la activación de la senescencia celular (Brazvan et al., 2018; Gorbunova & Seluanov, 2003; Yu & Kang, 2013).

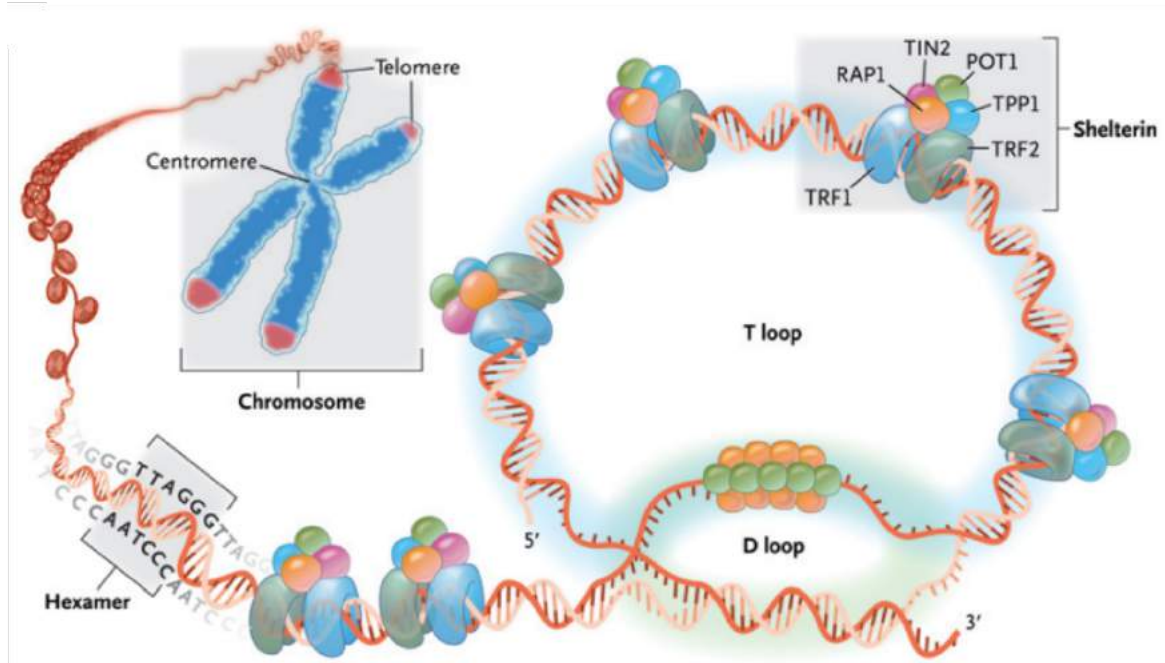
El acortamiento de los telómeros durante el proceso de replicación celular suele estar asociados adicionalmente con modificaciones o daños del DNA, los cuales llevan al secuestro del ciclo celular y la detención de la proliferación, esto dado que por cada proliferación celular hay pérdida de gran cantidad de bases de nucleótidos en los telómeros que puede estar acoplado a posibles modificaciones de genes de control de ciclo celular e incluso de genes asociados a la estabilización del telómero y su expresión.

Algunos estudios han demostrado que la alteración en las proteínas de unión a los telómeros causa senescencia primaria en las células, por ejemplo, estableciendo que la inhibición de la expresión de TRF2 en fibroblastos primarios humanos inducía senescencia debido a la activación secundaria de la proteína P53 (Brazvan et al., 2018).

#### **2.4.1.3. Telómeros: Estructura y función.**

Los telómeros son estructuras de heterocromatina especiales ubicadas en la parte final de los cromosomas y que cumplen diferentes funciones. Están compuestos por secuencias repetitivas de ADN (repeticiones en tándem de TTAGGG), asociadas con una serie de proteínas que forman un complejo conocido como "Shelterin" (Figura 1).





**Figura 1. Estructura del telómero** (Calado & Young, 2009)

Este complejo está relacionado con la estabilización del bucle de finalización del telómero (t-loop) y su principal función es proteger el extremo expuesto de los cromosomas lineales. Los telómeros están establecidos adicionalmente por una hebra rezagada rica en C y una hebra líder rica en G, que termina en una cadena sencilla 3', la cual está compuesta por repeticiones de nucleótidos monocatenarias. Este hebra libre o cadena sencilla tiene la capacidad de interactuar y unirse al DNA de doble cadena y facilita la formación de la estructura del t-loop.

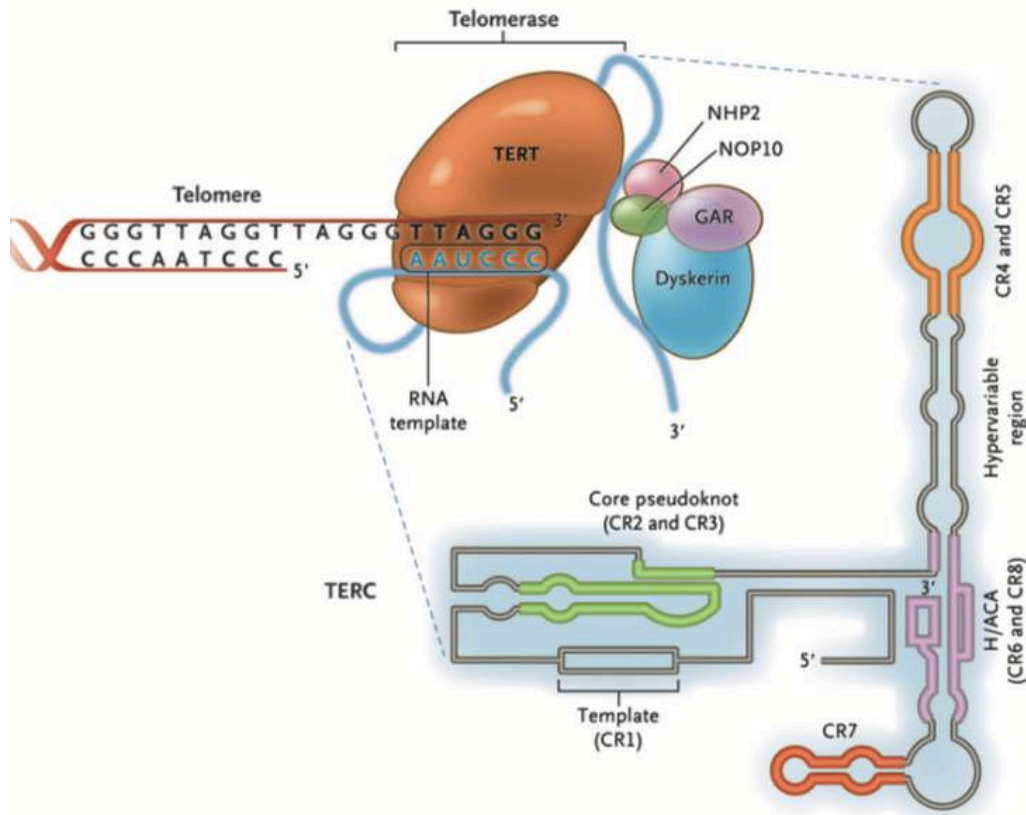
El complejo "Shelterin" está compuesto de seis proteínas: El factor de unión a la repetición telomérica 1 (TRF1), factor de unión a la repetición telomérica 2 (TRF2), proteína de interacción a TRF2 (RAP1), factor nuclear 2 de interacción a TRF1 (TIN2), proteína homóloga a displasia adrenocortical (TPP1) y proteína de protección de telómeros 1 (POT1). TRF1 y TRF2 se unen a secuencias teloméricas bicatenarias, mientras que POT1 se une al saliente 3' monocatenario. Esta estabilización y protección del telómero previene fusiones o recombinaciones y asiste la replicación del DNA (Buys, 2000; Lu, Zhang, Liu, Songyang, & Wan, 2014; Meiliana, Dewi, & Wijaya, 2017). Dentro del ciclo celular normal estas estructuras se ven afectadas por el proceso de replicación del DNA, llevando al acortamiento

progresivo del tamaño de los telómeros en las células, proceso que establece su entrada a ciclo celular. Sin embargo en las células germinales el proceso de acortamiento de los telómeros no se da debido a que el complejo enzimático de la telomerasa se encuentra activo, el cual evita este acortamiento celular y permite entonces que estas células no entren en procesos de senescencia, sin embargo en las células de tipo adulto tales como las MSCs este complejo enzimático se encuentra silenciado (Buys, 2000; Lu et al., 2014; Meiliana et al., 2017).

#### **2.4.1.4. Telomerasa humana (hTERT)**

La telomerasa humana (hTERT) es una transcriptasa reversa que tiene la capacidad de agregar repeticiones en tándem en los extremos teloméricos, evitando así el acortamiento de los telómeros cromosomales (Brazvan et al., 2018).

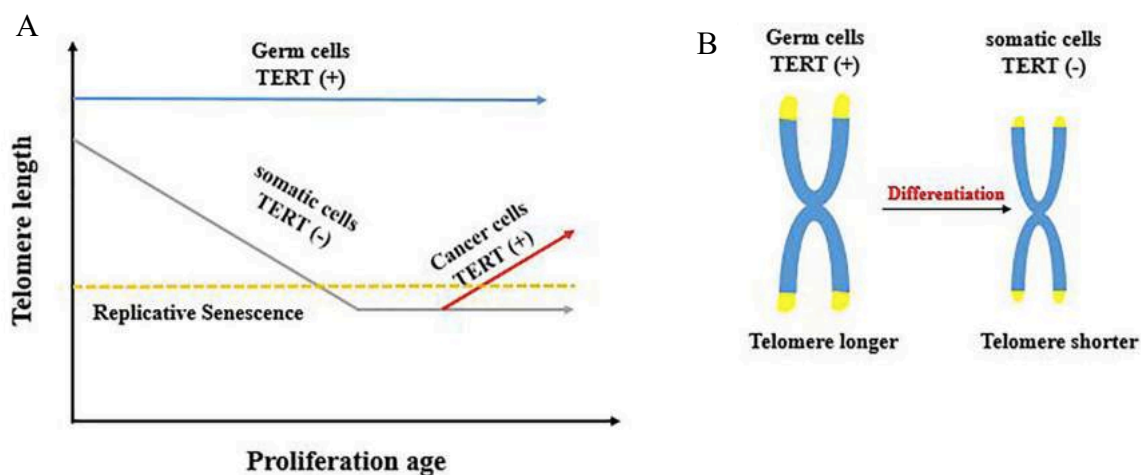
Este complejo enzimático está compuesto por dos partes, la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) y el componente de ARN de la telomerasa (TERC) el cual es usado como plantilla para sintetizar el ADN del telómero. La unidad catalítica de la telomerasa contiene dos copias cada una de TERT, TERC y disquerina (DKC1), y proteínas que estabilizan el complejo (Calado & Young, 2009).



**Figura 2. El complejo de la telomerasa humana y sus componentes.** (Calado & Young, 2009)

La telomerasa tiene la capacidad entonces de elongar el extremo telomérico del DNA mediante el uso de una plantilla de RNA con una secuencia repetitiva AAUCCC, evitando de esta manera que el proceso de replicación del DNA dé como resultado el acortamiento de los telómeros y por lo tanto eliminando la posibilidad de afección de genes y la entrada en senescencia replicativa de las células (Calado & Young, 2009).

La telomerasa tiene un efecto directo en el tamaño de los telómeros a medida que avanza la etapa proliferativa, se ha demostrado como en las células germinales que presentan actividad de la telomerasa humana, se mantiene la longitud de los telómeros estable durante toda su edad proliferativa, mientras que en aquellas células en las que no hay actividad de la telomerasa, como todas las células somáticas adultas, hay acortamiento y disminución en la longitud de los telómeros a medida que hay proliferación celular (Figura 3) (Brazvan et al., 2018).



**Figura 3. Efecto de la telomerasa en el acortamiento de los telómeros.** (Brazvan et al., 2018)

Se ha observado que células que logran la reactivación de la función del complejo de la telomerasa logran escapar de la senescencia replicativa y entrar nuevamente en etapa proliferativa, estableciendo esta como una opción para el aumento en la esperanza de vida de las células; sin embargo, cuando hay modificaciones genéticas o metabólicas adicionales en las células que logren superar esta activación de la telomerasa se puede observar la formación de células tumorogénicas que pueden llevar al establecimiento de cáncer (Brazvan et al., 2018).

#### 2.4.2. Métodos de Inmortalización.

Los principales métodos usados para la immortalización y obtención de líneas celulares son el aislamiento de células de cáncer, la inserción de genes de origen viral, la inserción de genes humanos que regulan senescencia, y el uso del hibrídoma.

El primero se basa en la obtención de células que provienen de un tejido cancerígeno, las cuales se obtienen mediante una biopsia de un paciente y se llevan a cultivo y posterior congelación, este fue el primer método de obtención de células immortalizadas teniendo como ejemplo la línea celular HeLa.

El segundo es la inserción de genes virales basado en el uso de genes que interfieren en la regulación del ciclo celular, afectando la proliferación y la señalización de senescencia y de esta manera evitando la muerte celular, algunos de los genes más usados son E1, SV40LT, E6 y E7 provenientes de diferentes virus como adenovirus, parvovirus, papiloma humano, entre otros. Estos genes codifican para proteínas que están encargadas de regular diferentes moléculas de señalización del ciclo celular en el momento de una infección, por ejemplo SV40LT es un gen que codifica para el antígeno largo del papovirus SV40 y que se encarga de llevar a cabo el secuestro de la proteína P53 relacionada con el proceso de detención del ciclo celular, evitando de esta manera que las células entren en procesos de senescencia replicativa, se aclara que en este caso al insertar genes que se encargan de codificar para antígenos específicos de los virus no hay posibilidad de infección o replicación de los virus dentro de las células (L Balducci et al., 2015; Luigi Balducci et al., 2014; Chen et al., 2011; Eva, Bram, Joery, Tamara, & Geert, 2014; Garcia-Mesa et al., 2017; Kamranvar & Masucci, 2017; T. M. Liu et al., 2013; Stepanenko & Kavsan, 2012; Trosko, 2014).

El tercero es la inserción de genes humanos que regulan senescencia, los cuales codifican proteínas que tienen roles principales para modular la inmortalidad celular, el más usado es el gen de la telomerasa humana que previene el acortamiento de los telómeros y por lo tanto inhibe la senescencia celular. Tanto estos genes como los genes virales se pueden insertar dentro del genoma de las células mediante el uso de cromosomas artificiales, vectores adenovirales o vectores lentivirales, aunque todos estos sistemas llevan a la finalidad de la inserción de los genes de interés se ha demostrado ampliamente que el uso de los lentivirus

como vectores de transducción tienen una mayor efectividad y presentan unas facilidades técnicas que lo proponen como uno de los mejores métodos para transducción celular (L Balducci et al., 2015; Chen et al., 2011; Eva, Bram, Joery, Tamara, & Geert, 2014; Garcia-Mesa et al., 2017; Kamranvar & Masucci, 2017; Liu et al., 2013; Stepanenko & Kavsan, 2012; Trosko, 2014).

Por ultimo la tecnología de hibridoma se usa específicamente en la generación de líneas de células B para la producción de anticuerpos y está basada en la integración de estas mismas con células cancerígenas de mieloma (L Balducci et al., 2015; Luigi Balducci et al., 2014; Chen et al., 2011; Eva et al., 2014; Garcia-Mesa et al., 2017; Kamranvar & Masucci, 2017; T. M. Liu et al., 2013; Stepanenko & Kavsan, 2012; Trosko, 2014)

### **2.4.3. Inmortalización de MSCs mediante expresión exógena de hTERT.**

De acuerdo con lo hallado en la literatura la obtención de líneas celulares a partir de la sobreexpresión o expresión exógena de telomerasa humana (hTERT) es uno de los métodos más ampliamente utilizados. En las células humanas, a medida que avanza el tiempo de vida, los telómeros se acortan durante la división celular, lo que lleva a la senescencia en el momento que los telómeros son demasiado cortos. En varios estudios como los de Liu, Chen, Trosko y Tátrai, entre otros, se ha llevado a cabo el uso del gen de la telomerasa (hTERT), el cual ha sido transducido a diferentes líneas celulares humanas, permitiendo de esta forma la expansión de la esperanza de vida de las mismas in vitro y la conservación de sus propiedades y funciones (L Balducci et al., 2015; Luigi Balducci et al., 2014; Chen et al., 2011; Escoffier et al., 2005; Gao et al., 2008; Giri & Bader, 2014; T. M. Liu et al., 2013; Tátrai et al., 2012).

En estudios recientes líneas de células madre mesenquimales fueron generadas a partir de MSCs obtenidas de las placas coriónicas y basal de la placenta, llevando a cabo la

transducción con la telomerasa humana (hTERT) mediante transducción lentiviral, permitiendo así la creación de las líneas celulares CMSC29 y DMSC23 respectivamente, reportando en estas la expansión de la esperanza de vida y la conservación de las características celulares propias de MSC incluyendo la expresión de marcadores de superficie celular y el potencial de diferenciación multipotente, además de no observar un cambio en la expresión génica asociada con senescencia, como el aumento en la expresión de  $\beta$ -galactosidasa, respecto al cultivo celular de origen. (L Balducci et al., 2015; Luigi Balducci et al., 2014; Chen et al., 2011).

Adicional a la aplicación en células derivadas de placenta, se han realizado una amplia gama de estudios que evalúan la immortalización y creación de líneas celulares a partir de otros linajes, como células mesenquimales derivadas de tejido adiposo, entre otros, los cuales han demostrado el aumento de la esperanza de vida de las líneas celulares y lo más importante la conservación de las características típicas del linaje proveniente (L Balducci et al., 2015; Luigi Balducci et al., 2014; Chen et al., 2011; Escoffier et al., 2005; Giri & Bader, 2014; Kamranvar & Masucci, 2017; T. M. Liu et al., 2013; Stepanenko & Kavsan, 2012).

Actualmente, existen múltiples líneas celulares de MSCs obtenidas a partir de la transducción únicamente de hTERT (Tabla 1), las cuales demostraron conservar las características celulares propias de las MSCs (expresión de marcadores de superficie, potencial de diferenciación multilínea, conservación de la expresión génica, así como, del potencial regenerativo) con aumento de la supervivencia y permanencia de la proliferación por encima de pasajes 21 a 30 (Böker et al., 2008; Giri & Bader, 2014; Kamranvar & Masucci, 2017; T. M. Liu et al., 2013; Mihara et al., 2003; Stepanenko & Kavsan, 2012; Wolbank et al., 2011).

Sin embargo, también existen reportes que determinan que la expresión exógena de telomerasa humana no es suficiente para immortalizar las MSCs y que es necesario acoplar también la expresión de oncogenes tales como E6, E7, Bmi1 y SV40LT para generar las líneas celulares (Tabla 2)

**Tabla 1.** Líneas celulares obtenidas a través de la expresión exógena de telomerasa humana hTERT.

Autor	Año	Revista	Tipo celular	Línea	País
K Mihara	2003	British Journal of Haematology	BM-MSCs	BM-MSCs inmortalizadas	Memphis, USA.
W Böcker et al	2008	Journal of Cellular and molecular Medicine	BM-MSCs	hMSC inmortalizada con hTERT	Alemania
Wolbank et al	2009	Tissue Engineering	A-MSCs	ASC52telo	Austria
Wolbank et al	2009	Tissue Engineering	hAmnio-MSCs	hAMSC76telo	Austria
S Q. Qin	2016	Placenta	MSC-fetales coriónicas	CMSC29	Australia
S Q. Qin	2016	Placenta	MSC-maternas (cotiledón central placentario)	DMSC23	Australia

**Tabla 2.** Líneas celulares obtenidas a través de la expresión exógena de telomerasa humana hTERT acoplada al uso de oncogenes.

Autor	Año	Revista	Tipo celular	Línea	País	Oncogenes
Okamoto	2002	Biochemical and Biophysical Research Communications	hMSCs	hMSCs	Japon	E6 E7
Balducci	2016	Stem Cell Research & Therapy	A-MSCs	hASC-TE. hASC-TS	Italia	E6-E7 SV-40
Tong Ming Liu	2013	Stem cells and Development	BM-MSCs	hTERT p53 knockdown BM-MSCs	Singapur	miRNA p53
P Tátrai	2012	Biochemical and Biophysical Research Communications	A-MSCs	ASC Bmi-1 hTERT. ASC SV40-hTERT	Hungria	Bmi-1. SV40



### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Cultivo primario de A-MSCs.

Se tomaron muestras de lipectomías o liposucciones, de aproximadamente 5 gramos cada una, provenientes del tejido adiposo blanco de la región abdominal de individuos adultos sanos (18 - 30 años), mujeres en su totalidad, previo consentimiento informado de los pacientes. Las muestras fueron lavadas con PBS suplementado con penicilina (100U/ml), estreptomicina (100µg/ml) y neomicina (200mg/ml), lo que permitió su posterior tratamiento llevando a cabo cortes del tejido para generar explantes de 2 mm<sup>3</sup> a 5 mm<sup>3</sup>.

Se sembraron los explantes en cajas plásticas de cultivo de 6 pozos con medio completo (OPTIMEM suplementado con 5% de lisado de plaquetas humanas (hPL), 1% de L-glutamina y 1 % de antibiótico-antimicótico: penicilina (100U/ml) + estreptomicina (100µg/ml)) y se llevaron a cultivo a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Se realizó cambio de medio dos veces por semana o antes en caso de ser necesario de acuerdo con el comportamiento de las células y se realizó pasaje celular en el momento en que las células alcanzaban el 80% de confluencia en la caja.

Para la recolección de las células para las diferentes evaluaciones necesarias se aplicó TrypLE™ (GIBCO) para su desprendimiento y se adiciono posteriormente el medio de cultivo completo respectivo para inhibir el efecto del TrypLE™ sobre las células y llevar a un volumen total de 2 ml, que se centrifugaron a 1200 revoluciones por minuto (rpm) eliminando el sobrenadante con TrypLE™ y resuspendiendo nuevamente en medio de cultivo completo. Las células en suspensión se usaron para realizar los pasajes necesarios en nuevas cajas de cultivo T25 o T75 y en los diferentes ensayos de caracterización y transformación.

### 3.2. Evaluación fenotípica de las A-MSCs.

Las A-MSCs se caracterizaron inmunofenotípicamente mediante citometría de flujo.

5x10<sup>5</sup> A-MSCs de cada uno de los lotes celulares se incubaron con anticuerpos monoclonales humanos mostrados en la Tabla 3:

**Tabla 3.** Anticuerpos monoclonales para inmunofenotipificación por citometría de flujo.

ANTICUERPO MONOCLONAL	CLON	ISOTIPO	MARCA
Anti-CD34 PE-Cyanine 7	4H11	IgG1, kappa	eBioscience™
Anti-CD45 APC-efluor 780	H130	IgG1, kappa	eBioscience™
Anti-CD90 (Thy-h1) FITC	eBIO5E10	IgG1, kappa	eBioscience™
Anti-CD105 (Endoglin) PE	SN6	IgG1, kappa	eBioscience™
Anti-HLA-ABC APC	W6/32	IgG2a, kappa	eBioscience™
Anti-HLA-DR PE-Texas red	TU36	IgG2b	eBioscience™

Un mínimo de 10.000 eventos fue registrado por cada muestra. Las lecturas se realizaron con el citómetro FACSCanto™ (BD Biosciences®) dispuesto en el área de citometría de flujo del laboratorio de equipos comunes de la Facultad de Medicina de la sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia y para el análisis de los datos se empleó el software FlowJo (Treestar Inc, USA).

### 3.3. Ensayos de diferenciación celular.

#### 3.3.1. Diferenciación adipogénica

Se sembraron células de tercer pasaje A-MSCs por duplicado en caja de 12 pozos (Corning TM) y se incubaron bajo atmósfera humidificada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar

confluencia del 90-100% y se inició el proceso de diferenciación adipogénica cambiando el medio de cultivo suplementado por medio inductor de diferenciación adipogénica StemPro<sup>TM</sup> adipogenesis differentiation kit (Life Technologies, Gibco<sup>TM</sup>) durante 14 días (renovando el medio de cultivo dos veces por semana), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Como control negativo se usaron células cultivadas en medio estándar (OPTIMEM suplementado con 5% lisado de plaquetas humanas (hPL), L-glutamina 1% y antibiótico-antimicótico 1%) a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y los ensayos se realizaron por duplicado.

La evaluación de la diferenciación adipogénica se realizó en las células cultivadas al finalizar el cultivo. Se verificó la presencia de vacuolas citoplasmáticas de grasa en las A-MSCs mediante tinción de Red Oil.

### **3.3.2. Diferenciación osteogénica**

Se sembraron células de tercer pasaje A-MSCs por duplicado en caja de 12 pozos (Corning<sup>TM</sup>) y se incubaron bajo atmósfera humidificada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar confluencia del 70-80% y se inició el proceso de diferenciación osteogénica cambiando el medio de cultivo suplementado por medio inductor de diferenciación osteogénica StemPro<sup>TM</sup> osteogenesis differentiation kit (Life Technologies, Gibco<sup>TM</sup>) durante 21 días (renovando el medio de cultivo dos veces por semana), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La evaluación de la diferenciación osteogénica se realizó en la tercera semana mediante tinción de Alizarin Red para ver depósitos de calcio.

### **3.3.3. Diferenciación condrogénica**

---

Se sembraron células de tercer pasaje A-MSCs por duplicado en caja de 12 pozos (Corning TM ) y se incubaron bajo atmósfera humidificada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar confluencia del 70-80% y se inició el proceso de diferenciación condrogénica cambiando el medio de cultivo suplementado por medio inductor de diferenciación condrogénica StemPro TM adipogenesis differentiation kit (Life Technologies, Gibco TM ) durante 21 días (renovando el medio de cultivo dos veces por semana), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Como control negativo se usaron células cultivadas en medio estándar (OPTIMEM suplementado con 5% lisado de plaquetas humanas (hPL), L-glutamina 1% y antibiótico-antimicótico 1%) a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y los ensayos se realizaron por duplicado.

Se verificó la presencia de matriz cartilaginosa mediante tinción de Alcian Blue.

### **3.4. Transducción lentiviral.**

La transducción lentiviral es un método para insertar genes dentro de las células para obtener la expresión de estos. Para inducir la inmortalización de las A-MSCs se empleó un lentivirus con el gen de la telomerasa humana (hTERT). Estos lentivirus se obtuvieron a partir del proceso de transfección de células HEK293FT con vectores que poseen el gen para hTERT y los genes que codifican para los elementos de empaquetamiento e inserción lentivirales, los cuales fueron donados por el Dr. Arturo Londoño del Grupo de Investigación sobre telómeros y senescencia celular del Instituto de Investigación Curie en Francia.

#### **3.4.1. Plásmidos.**

Los plásmidos donados por el Instituto Curie se recibieron como una pequeña muestra en papel filtro en áreas de aproximadamente 3 mm de diámetro, se recortaron con instrumentos estériles y se depositaron en 200 µl de TE (Tris EDTA) toda la noche a 4°C para su recuperación. Estos plásmidos son:

- 1) pVSV-G, contenedor del gen VSV-g que codifica para la glicoproteína G, relacionada con el traspaso de la membrana celular y la infección lentiviral.
- 2) pCMRVΔR8.91, contenedor de los genes gag y pol, que codifican para las proteínas relacionadas con la envoltura y empaquetamiento del virus.
- 3) pWPIR-hTERT-GFP que posee el gen de interés para la telomerasa acoplado con el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) como marcador de selección.

Todos los plásmidos poseen un marcador de selección procariótico que codifica para un gen de resistencia a la ampicilina.

### **3.4.2. Transformación de *Escherichia coli* con plásmidos de interés.**

Para cada plásmido se realizó el proceso de manera independiente, lo que implica que cada uno se transformó en una población diferente de *E. coli* y que no había células con más de uno de los tres tipos de plásmido, obteniendo tres diferentes cepas de *E.coli*. La selección de las bacterias con transformación efectiva se realizó mediante cultivo en ampicilina (Ausubel et al., 2002).

Se llevó a cabo la transformación de *E. coli DH5α*, para la inserción de los plásmidos pVSV-G, pCMRVΔR8.91 y pWPIR-hTERT-GFP dentro de las células, usando el protocolo modificado de Transformación de alta eficiencia mediante electroporación del *Short Protocols in Molecular Biology*:

1. Inocular 5 ml de caldo LB (Luria-Bertani) con una colonia de células *E coli DH5α* y crecer toda la noche a 37°C con agitación moderada.
2. Inocular 2.5 ml del cultivo en 250 ml de medio LB en un frasco estéril de 2 litros. Creciendo a 37°C, 300 rpm de agitación, hasta llevar a una densidad óptica OD<sub>600</sub> de aproximadamente 0.5 a 0.6.

3. Ubicar por 10 a 15 min en un baño de hielo y transferir a tubos falcón de 50 ml pre enfriados.
4. Centrifugar 10 minutos a 5000 g, 4°C. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 5 ml de agua tipo HPLC fría.
5. Centrifugar 10 minutos a 5000 g, 4°C y descartar el sobrenadante.
6. Agregar 250 ml de agua tipo HPLC fría, mezclar bien y centrifugar nuevamente (5000 g, 4°C).
7. Inmediatamente eliminar el sobrenadante, resuspender el pellet mediante el uso de vortex en el líquido remanente y repetir el paso 6.
8. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en el líquido residual mediante turbulencia.
9. Agregar 40 ml de glicerol 10% pre enfriado y mezclar bien. Centrifugar 10 minutos a 5000 g, 2 °C y resuspender en un volumen igual de glicerol 10%. Realizar alícuotas de 50µl de la suspensión de células en tubos de criopreservación y almacenar a -80°C hasta su uso.
10. Ubicar el electroporador a 2.5 kV, 25 µF. Ubicar el controlador de pulso de 200 a 400 ohms.
11. Agregar de 5 pg a 0,5 µg de plásmido a un tubo con las células descongeladas obtenidas en el paso 9 y mezclar.
12. Transferir la mezcla a una celda de electroporación pre enfriada, ubicar la celda en el electroporador y realizar el pulso de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
13. Remover la cubeta rápidamente y transferir las células a un tubo de cultivo de 10 ml estéril con 1 ml de medio SOC precalentado. Incubar de 30 a 60 minutos con agitación moderada a 37°C.
14. Sembrar 10, 25 y 50 µl de células en el medio SOC en cajas de agar LB-ampicilina. Cultivar toda la noche a 37°C.
15. Seleccionar las colonias de células transformantes y cultivar en 50 ml de medio LB-ampicilina

### 3.4.3. Extracción y purificación de plásmidos.

Se cultivó una de las colonias positivas a la selección obtenidas en medio de cultivo LB-ampicilina y se procedió al proceso de extracción según indicaciones y modificaciones del protocolo de amplificación y extracción de plásmidos descrito en *Short Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., 2002):

1. Tomar una muestra de las células transformantes y cultivar en 5 ml de medio LB-ampicilina e incubar toda la noche a 37°C con agitación.
2. Inocular 50 ml de medio LB-ampicilina con 1 ml de las células crecidas en el paso 1. Crecer durante toda la noche a 37°C hasta la saturación del cultivo ( $OD_{600} = 4$ ).
3. Centrifugar 10 minutos a 6000 g, 4°C.
4. Resuspender el pellet en 4 ml de solución GTE (Glucosa-Tris-EDTA) y transferir a un tubo falcón de 50 ml.
5. Agregar 1 ml de solución GTE que contenga 25 mg/ml de lisozima de huevo blanco de gallina (concentración final 5 mg/ml). Mezclar completamente y dejar 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Agregar 10 ml de NaOH/SDS y mezclar por pipeteo hasta que la solución se torne homogénea y clara. Dejar 10 minutos en hielo.
7. Agregar 7,5 ml de acetato de potasio 3 M y mezclar por pipeteo hasta que la viscosidad se reduzca y se forme un precipitado largo. Dejar 10 minutos en hielo.
8. Centrifugar 10 minutos a 20000 g, 4°C y decantar el sobrenadante en un tubo falcón de 50 ml estéril.
9. Agregar 0,6 volúmenes de isopropanol en comparación al sobrenadante descartado, mezclar por inversión, y dejar 5 a 10 minutos en temperatura ambiente.
10. Centrifugar por 10 minutos a 15000 g, temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante y lavar el pellet con 2 ml de etanol al 70%.
11. Centrifugar por 10 minutos a 15000 g, temperatura ambiente, aspirar el etanol y secar el pellet por vacío. Almacenar indefinidamente a 4°C.

---

Para cada cepa obtenida anteriormente (*E. coli* hTERT-GFP; *E. coli* VSV-G; *E. coli* GAG-POL) se realizó el proceso anterior descrito de manera independiente, lo que implica que se obtuvieron los tres diferentes plásmidos puros y sin presencia de alguno de los otros dos. (Ausubel et al., 2002).

La purificación de cada uno de los plásmidos para eliminar posibles contaminantes nucleicos como DNA cromosomal o RNA se llevó a cabo con el kit DNA Clean & Concentrator<sup>TM</sup>-5 (ZYMO RESEARCH), siguiendo las especificaciones del fabricante.

#### **3.4.4. Producción del lentivirus con el constructo hTERT-GFP.**

Para la producción de los lentivirus de interés se realizó la transfección de la línea celular HEK293FT con los tres plásmidos purificados mediante el uso de lipofectamina. Se emplearon  $1.8 \times 10^6$  células HEK293FT con viabilidad superior al 90% cultivadas en medio DMEM suplementado con SFB al 5% sin antibiótico. Este procedimiento se realizó de acuerdo con el protocolo establecido por el grupo de investigación durante la realización de este trabajo con el apoyo del Instituto Dermatológico Federico Lleras descrito a continuación:

1. En 2 tubos de polipropileno de 50 ml nuevos y estériles adicionar 1875  $\mu$ l de Opti-MEM I y marcar uno con la letra D y el otro con la letra L. Adicionar a los tubos D una cantidad total del 30  $\mu$ g de DNA plasmídico total, incluyendo los tres plásmidos, pipeteando y distribuyendo de manera equimolar cada uno de los constructos necesarios.
2. Adicionar a los tubos marcados con L 2  $\mu$ l del reactivo lipofectamina por cada 1  $\mu$ g de DNA, mezclando bien mediante pipeteo. Para 30  $\mu$ g de DNA usar 60  $\mu$ l de lipofectamina. Incube por 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Combinar las soluciones de los tubos D y L y mezclar suavemente mediante pipeteo (6 veces).



4. Incubar la mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos de DNA-Lipofectamina.
5. En un tubo falcón de 50ml con 22 ml de medio completo sin antibióticos adicionar  $18 \times 10^6$  células HEK293FT en suspensión mezclar y distribuir 10ml de esta suspensión en 2 botellas de cultivo de  $75\text{cm}^2$  (marcadas como 1A, 1B).
6. Mezclar suavemente mediante pipeteo los complejos de DNA-Lipofectamina preparados en el paso 3 y adicionar la mitad del contenido a cada caja de cultivo de  $75\text{cm}^2$  (3842  $\mu\text{l}$  para cada caja) con las células. Agitar cuidadosamente con movimientos circulares las cajas, manteniéndolas horizontalmente.
7. Incubar las células toda la noche (12 horas) bajo condiciones de cultivo a  $37^\circ\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$ .
8. Remover el medio de cultivo de cada caja y transferirlo a un tubo estéril de 15ml marcado como A o B. Adicionar 8ml de medio completo con Butirato de Sodio (DMEM, SFB 5%, glutamina 1% butirato de sodio 10mM) precalentado a cada caja conteniendo las células adherentes. Centrifugar los tubos A y B a  $300 \times g$  por 10 minutos y temperatura ambiente con el fin de recuperar las células que se hayan desprendido. Conservar el sobrenadante y almacenarlo en tubos estériles debidamente marcados (hTERT-GFP con la letra A o B dependiendo de la caja de la que se obtenga) y almacenar a  $4^\circ\text{C}$ .
9. Resuspender el pellet en 2ml de medio completo con Butirato de Sodio y retornarlo a la caja correspondiente, para completar los 10 ml del volumen de cultivo e incubar las células por 8 horas a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ .
10. Remover el medio de cultivo de cada caja y transferirlo a un tubo estéril de 15ml marcado como A o B. Adicionar 8ml de medio completo (DMEM, SFB 5%, glutamina 1%) precalentado a cada caja conteniendo las células adherentes. Centrifugar los tubos A y B a  $300 \times g$  por 10 minutos y temperatura ambiente con el fin de recuperar las células que se hayan desprendido. Conservar el sobrenadante y almacenarlo en tubos estériles debidamente marcados (hTERT-GFP con la letra A o B dependiendo de la caja de la que se obtenga) y almacenar a  $4^\circ\text{C}$ .

11. Resuspender el pellet en 2ml de medio completo y retornarlo a la caja correspondiente, para completar los 10 ml del volumen de cultivo e incubar las células toda la noche (12 horas) bajo condiciones de cultivo a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.
12. Repetir el paso 10 y 9, obteniendo nuevos tubos con el sobrenadante e incubar las células toda la noche (12 horas) bajo condiciones de cultivo a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.
13. Remover el medio de cultivo de las cajas que contiene los complejos virales y transferir el sobrenadante a un tubo estéril de 50 ml junto con los sobrenadantes obtenidos en los pasos anteriores conteniendo los virus de la recolección, mezclar mediante pipeteo y centrifugar a 2000 x g por 15 minutos a 4°C.
14. Filtrar el sobrenadante con filtro de membrana de 0.45µm de diámetro de poro. Transferir cada filtrado a un tubo nuevo estéril de 50 ml apropiadamente marcado y almacenar a 4°C si se van a utilizar dentro de las siguientes 3 semanas. Si se van a utilizar en un tiempo superior, dispensar alícuotas de 1ml y almacenar a -80°C. Esta filtración se realiza con el fin de eliminar las posibles células HEK que se hallan desprendido al recolectar los sobrenadantes.
15. Posteriormente realizar la concentración del virus empleando centricones con corte de peso molecular de 30 kDa. Este permite la concentración del lentivirus hasta 100 veces mediante centrifugación. Por último, transferir el concentrado lentiviral a crioviales en alícuotas de 200 µl marcados apropiadamente. Almacenar a -80°C indefinidamente hasta su uso.

### **3.4.5. Transducción de A-MSCs e inmortalización.**

Para llevar a cabo la transducción de las A-MSCs se utilizó el protocolo establecido durante el desarrollo de este trabajo por el grupo de investigación para tal fin:

1. Sembrar 3 pozos con células h-ASCs en placas de 6 pozos (200000 células/pozo) de los diferentes lotes celulares con 3 mL de medio de cultivo completo (Optimen, lisado plaquetario humano hpl 5%, L-glutamina 1%, antibiótico-antimicótico 1%).
2. Incubar durante 24 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

3. Retirar el medio de cultivo y lavar 2 veces con PBS.
4. Agregar a cada pozo 20  $\mu$ l del concentrado lentiviral junto con 1 ml de medio de cultivo sin antibiótico-antimicótico e incubar durante 48 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.
5. Retirar el medio de cultivo con las partículas virales y colocar medio de cultivo completo incubando durante 48 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.
6. Verificar mediante el uso de microscopía de fluorescencia la expresión de GFP en las células.

#### **3.4.6. Transducción de A-MSCs e immortalización con lentivirus comercial.**

Dado que no fue posible lograr la immortalización de las células mediante el uso del lentivirus hTERT-GFP, se decidió descartar la posibilidad de que este problema estuviera dado por el funcionamiento del lentivirus elaborado en el laboratorio por lo que adicionalmente se utilizó un lentivirus de carácter comercial en la segunda fase del proyecto, hTERT-puro-GFP (hTERT-lentivirus (CMV, GFP, Puro) PLV-10134-50, Cellomics Technology), el cual en el proceso de transducción se utilizó bajo la misma metodología del protocolo descrito anteriormente.

### **3.5. Cultivo y expansión de líneas.**

Se sembraron las células obtenidas en cajas de cultivo de 6 pozos con medio completo a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Se hizo cambio de medio dos veces por semana o cuantas veces fuera necesario según el comportamiento de las células y se cultivaron hasta alcanzar confluencia celular del 80% en el pozo. De cada pozo que proliferó efectivamente de la caja se hizo pasaje a una caja de cultivo T25 y se llevó a cabo el seguimiento de las células.

### **3.6. Evaluación de la transducción celular.**

#### **3.6.1. Evaluación de plásmidos**

Posterior a la extracción de los plásmidos y previo a la obtención de lentivirus con el constructo de interés se llevó a cabo una electroforesis en agar al 0,8% para la determinación de los tamaños de los plásmidos y de esta manera verificar la obtención de los plásmidos adecuados.

#### **3.6.2. Evaluación de la transducción por fluorescencia**

Las células transducidas con el lentivirus que poseía el constructo hTERT-GFP se evaluaron 24 horas posterior a la transducción y se siguieron evaluando en diferentes momentos posteriores y a través de los pasajes, mediante el uso de fluorescencia con el microscopio confocal ubicado en el laboratorio de Equipos comunes de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, con el fin de verificar la expresión de GFP en las células y usarlo como un marcador de la transducción.

Las células transducidas con el lentivirus que poseía el constructo hTERT-puro-GFP también se evaluaron bajo estas condiciones.

#### **3.6.3. Selección de células GFP+ mediante sorting por citometría de flujo.**

Las A-MSCs transducidas con el constructo hTERT-GFP se caracterizaron y se seleccionaron mediante citometría de flujo. Un mínimo de 10.000 eventos fue registrado por cada muestra. Las lecturas y separación se realizaron con el citómetro FACSCanto™ (BD Biosciences®) dispuesto en el área de citometría de flujo del laboratorio de equipos comunes

de la Facultad de Medicina de la sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia y para el análisis de los datos se empleó el software FlowJo (Treestar Inc, USA).

#### **3.6.4. Evaluación de la transducción mediante el cultivo con puromicina.**

Las células transducidas con el lentivirus que poseía el constructo hTERT-puro-GFP se evaluaron 24 horas y en algunos casos hasta 48 horas posterior a la transducción para permitir la expresión del gen de resistencia a puromicina. Se cultivaron en cajas de 6 pozos con puromicina a diferentes concentraciones (1, 2, 5 y 10  $\mu$ M) y se siguió su comportamiento durante 12, 24, 48 y 72 horas, o hasta que el total de las células entrara en muerte celular.

#### **3.6.5. Evaluación mediante inmunofluorescencia.**

Las células transducidas se evaluaron mediante el uso de inmunofluorescencia usando los anticuerpos Anti GFP (B2) Alexa Fluor 594 y Anti hTERT (A6) Alexa Fluor 647, para evaluar la presencia de las proteínas GFP y telomerasa humana, bajo el siguiente protocolo:

1. Retirar el medio de cultivo de los pozos de cultivo y lavar con 2 ml de PBS dos veces.
2. Agregar 1 ml de paraformaldehído al 4% para fijación de las células durante 20 minutos a temperatura ambiente.
3. Lavar con PBS dos a tres veces dejando por dos minutos cada lavado a temperatura ambiente.
4. Incubar la muestra con 1 ml de Triton X-100 al 0,5% durante 20 minutos a temperatura ambiente.
5. Lavar 2 veces con PBS-TWEEN, durante 3 minutos cada lavado a temperatura ambiente y lavar 2 veces con PBS.
6. Incubar con PBS-Albumina 5% durante 1 hora a temperatura ambiente y lavar dos veces con PBS.
7. Incubar la muestra con los anticuerpos (5  $\mu$ g/ml) durante toda la noche a 4°C.

8. Lavar con PBS-TWEEN dos veces por 5 minutos cada una y lavar con PBS dos veces más.
9. Realizar la incubación con DAPI para tinción de núcleos durante 30 minutos.
10. Eliminar el excedente lavando con PBS 3 veces y llevar a microscopia de fluorescencia.

### **3.6.6. Ensayo de agar**

Para evaluar la inmortalización celular efectiva in vitro, se realizó un ensayo de agar blando, de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Tomar una placa de 6 pozos estéril y sembrar en todos los pozos 1 ml de mezcla 1:1 de medio de cultivo completo (OptiMEM, antibiótico-antimicótico, l-glutamina, hPL) y agar base al 1%.
2. Mientras la mezcla solidifica, tomar una caja T25 de células, llevar al cabo el desprendimiento de las A-MSCs transducidas y llevar a cabo un conteo celular.
3. Tomar un total de  $1,2 \times 10^4$  células y mezclarla con una solución 1:1 de medio completo de cultivo y agarosa al 0,7%, y ubicar sobre la capa de agar solidificada.
4. Agregar medio completo y cambiar 2 veces por semana incubando a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 28 días.
5. Posterior a esto fijar con 1% de formaldehído y teñir con Cristal Violeta 0,05% para llevar a cabo la tinción de las colonias y su respectivo conteo.

## **4. Resultados**

### **4.1. Cultivos primarios de A-MSCs.**

#### **4.1.1. Muestras y obtención de A-MSCs.**

Se utilizaron 6 diferentes lotes celulares de A-MSCs para hacer los procesos de transducción del gen de hTERT (Tabla 2):

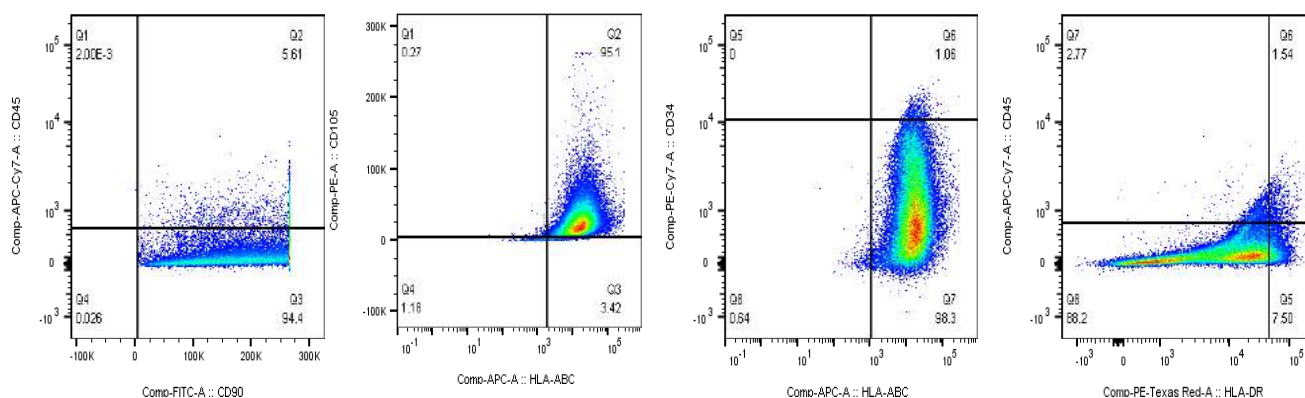
**Tabla 4.** Lotes celulares A-MSC utilizados en los procesos de transducción.

Código	Obtención muestra	Descripción del paciente	Fecha
ADSL4	LIPOSUCCIÓN	MUJER SANA, 28 AÑOS.	12-02-2017
ADSEX9	LIPECTOMIA	MUJER SANA, 36 AÑOS.	05-09-2017
ADSEX12	LIPECTOMIA	MUJER SANA, 27 AÑOS.	16-11-2017
ADSEX13	LIPECTOMIA	MUJER SANA, 33 AÑOS.	17-11-2017
ADSEX14	LIPECTOMIA	MUJER SANA, 22 AÑOS.	06-12-2017
ADSEX15	LIPECTOMIA	MUJER SANA, 31 AÑOS.	03-05-2018

De estas muestras se logró hacer la caracterización y evaluación completa de los lotes ADSEX12, ADSEX13 y ADSEX15.

#### 4.1.2. Caracterización inmunofenotípica de las A-MSCs

Las células utilizadas se caracterizaron inmunofenotípicamente encontrando que coinciden con la marcación para células madre mesenquimales.



**Figura 4.** Caracterización inmunofenotípica de ADS EX13.

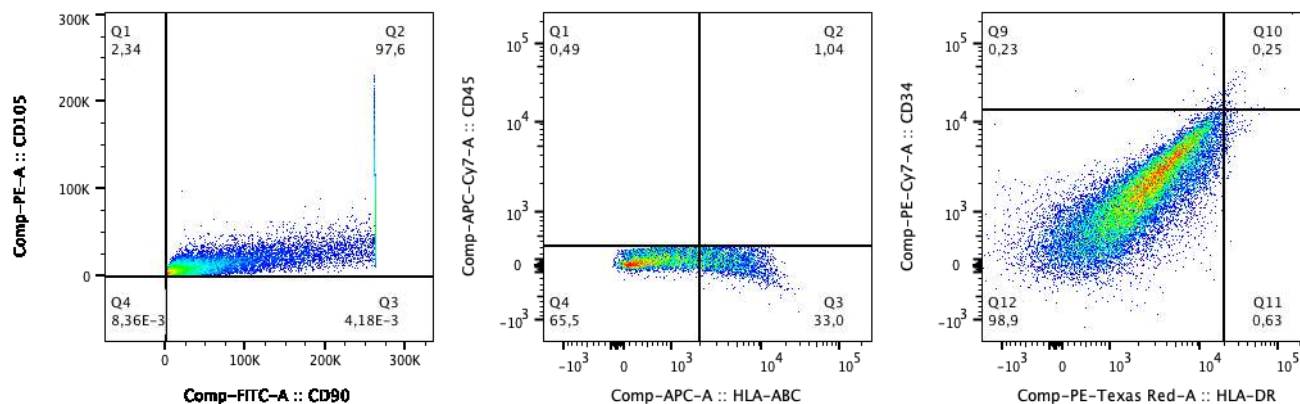


Figura 5. Caracterización inmunofenotípica de ADS EX12.

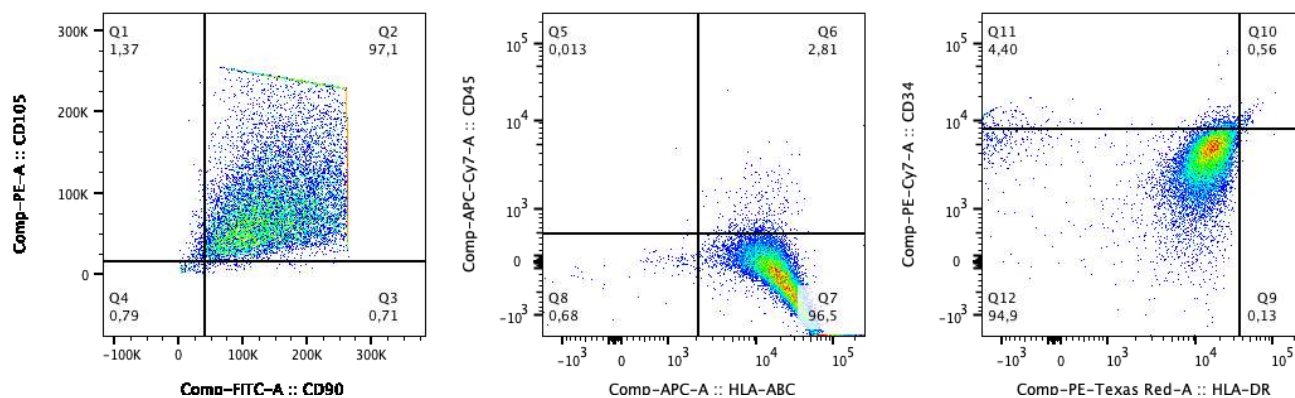


Figura 6. Caracterización Inmunofenotípica de ADSEX15

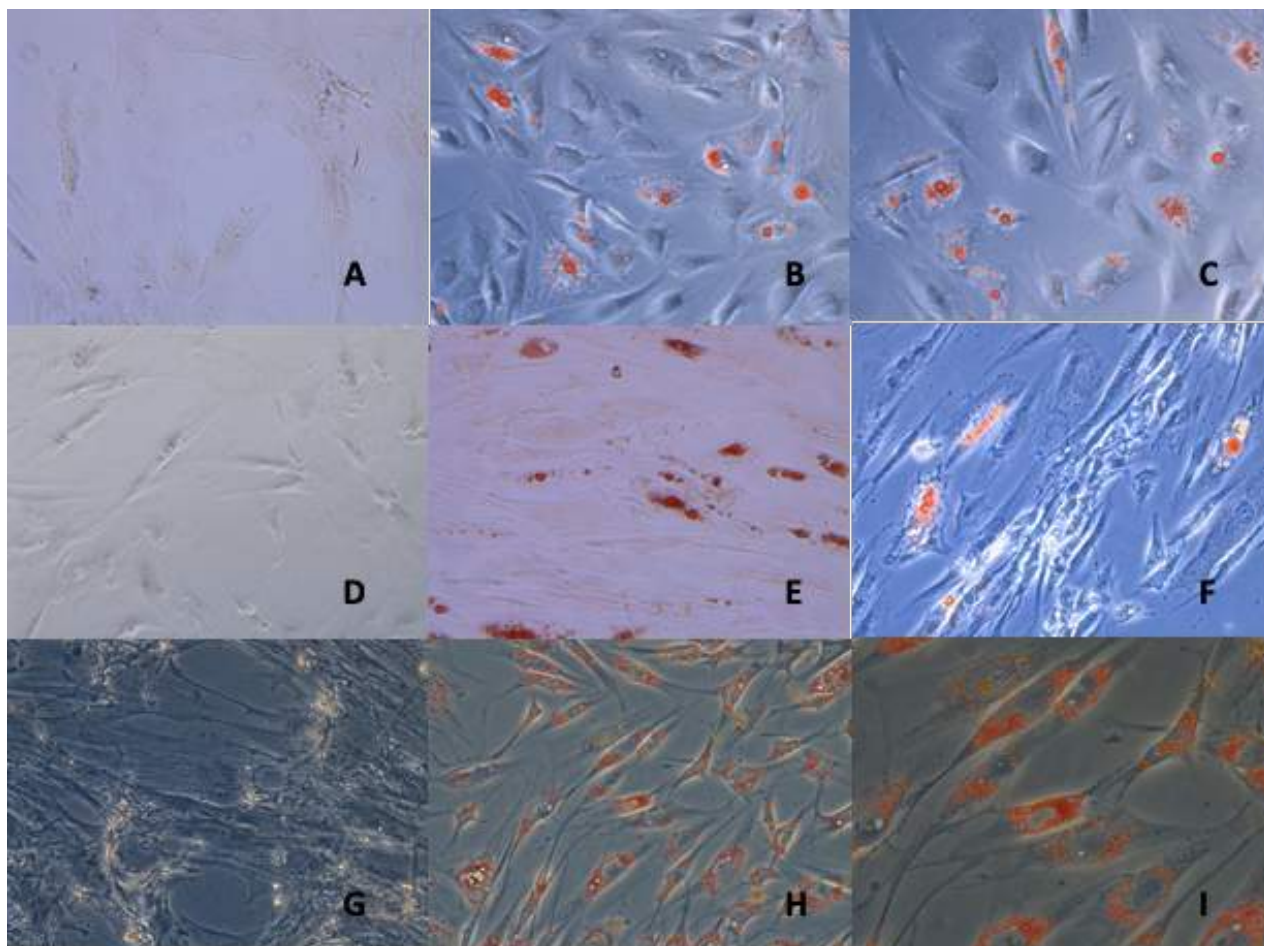
Se observa en los resultados como las células de los tres lotes tienen una marcación típica encontrada para las A-MSCs respecto a los marcadores evaluados (Fig. 4, 5 y 6).

#### 4.1.3. Capacidad de diferenciación celular de las A-MSCs

Las A-MSCs utilizadas, ADS-EX12, ADS-EX13 y ADS-EX15, presentaron capacidad de diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica, detectando efectivamente los

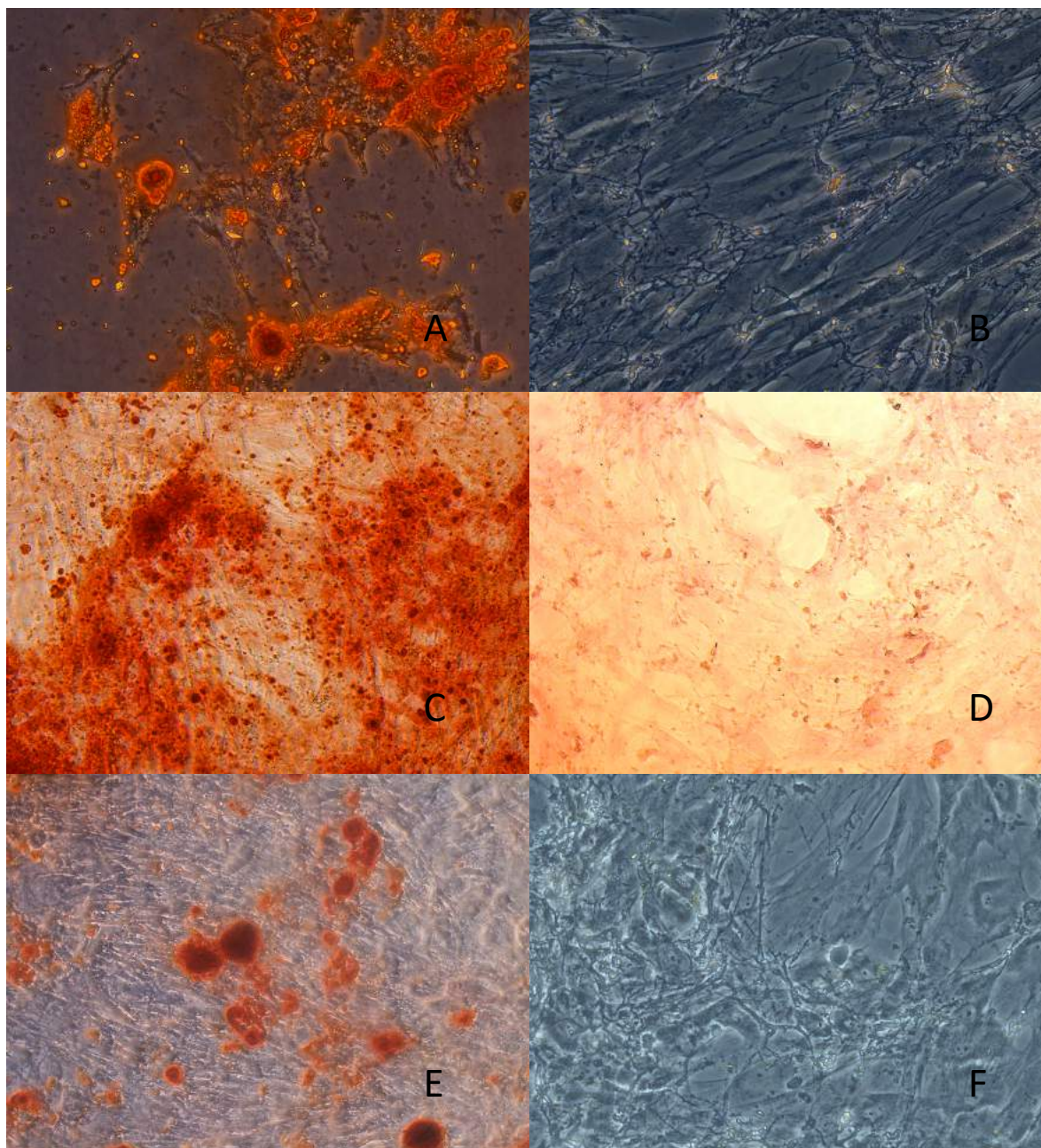


depósitos de calcio, las vacuolas lipídicas y la matriz cartilaginosa respectivamente, característica típica de las células madre mesenquimales (Fig. 7, 8 y 9).



**Figura 7. Tinción Red Oil de la diferenciación adipogénica de las A-MSCs.**

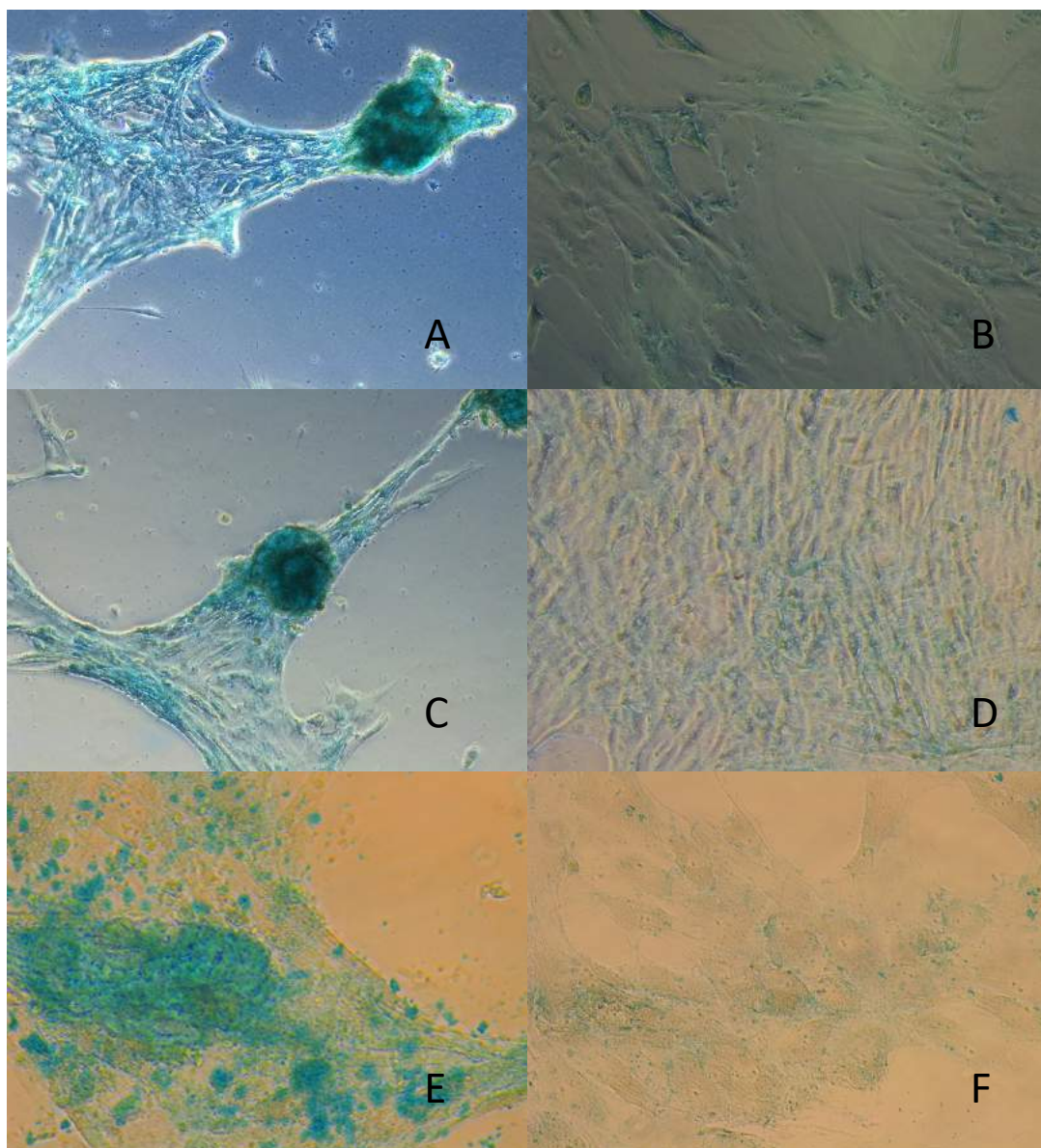
Se observa la diferenciación adipogénica de ADSEX12: Control (A) y diferenciación en aumento 10X(B) y 20X(C), ADSEX13: Control (D) y diferenciación en aumento 10X(E) y 20X(F), ADSEX15: Control (G) y diferenciación en aumento 10X(H) y 20X(I),



**Figura 8 Tinción Alizarin Red de la diferenciación osteogénica de las A-MSCs.**

Se observa la diferenciación osteogénica de ADSEX12 (A) y su control (B), ADSEX13 (C) y su control (D) y ADSEX15 (E) y su control (F).





**Figura 9. Tinción Alcian Blue de la diferenciación condrogénica de las A-MSCs.**

Se observa la diferenciación condrogénica de ADSEX12 (A) y su control (B), ADSEX13 (C) y su control (D) y de ADSEX15 (E) y su control (F).

## 4.2. Evaluación de la transducción celular.

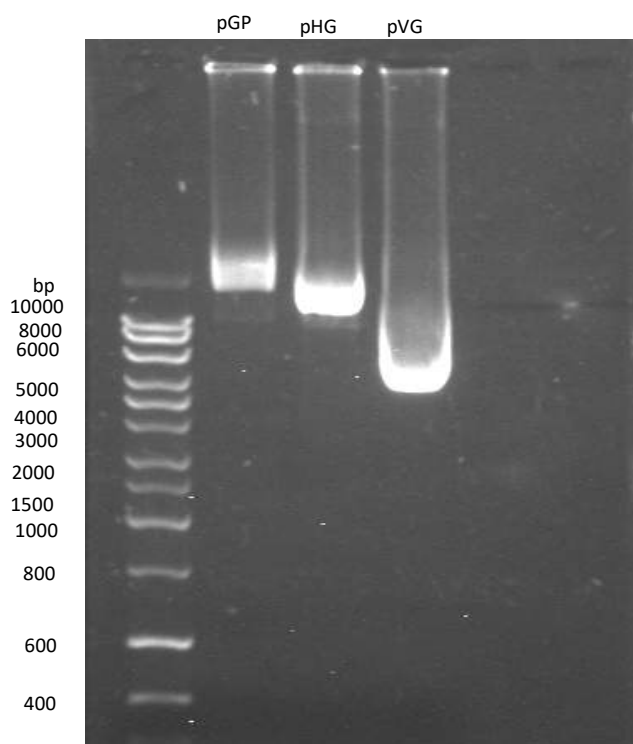
### 4.2.1. Evaluación de plásmidos

Se realizó la cuantificación de los plásmidos extraídos, encontrándolos en condición adecuada para el proceso de transfección, es decir en concentración adecuada y en un buen estado de pureza, determinado gracias a los índices de absorbancia 260/280 y 260/230 (Tabla 5).

**Tabla 5.** Concentración de plásmidos posterior a la extracción.

Código	Plásmido	Genes	Tamaño (bp)	Concentración (ng/μl)	Índice Absorbancia 260/280	Índice Absorbancia 260/230
pVG	pVSV-G	VSV-g	6500	958 ± 6,8	2,1 ± 0	2,4 ± 0,1
pGP	pCMRVΔR8.91	gag y pol	12060	1222,8 ± 95	2,1 ± 0	2,4 ± 0
pHG	pWPIR-hTERT-GFP	hTERT y GFP	10006	762 ± 12,3	2,1 ± 0	2,5 ± 0,1

Posterior en la electroforesis se observaron bandas acordes a las concentraciones medidas y concordantes con los tamaños esperados para cada plásmido (Figura 10).

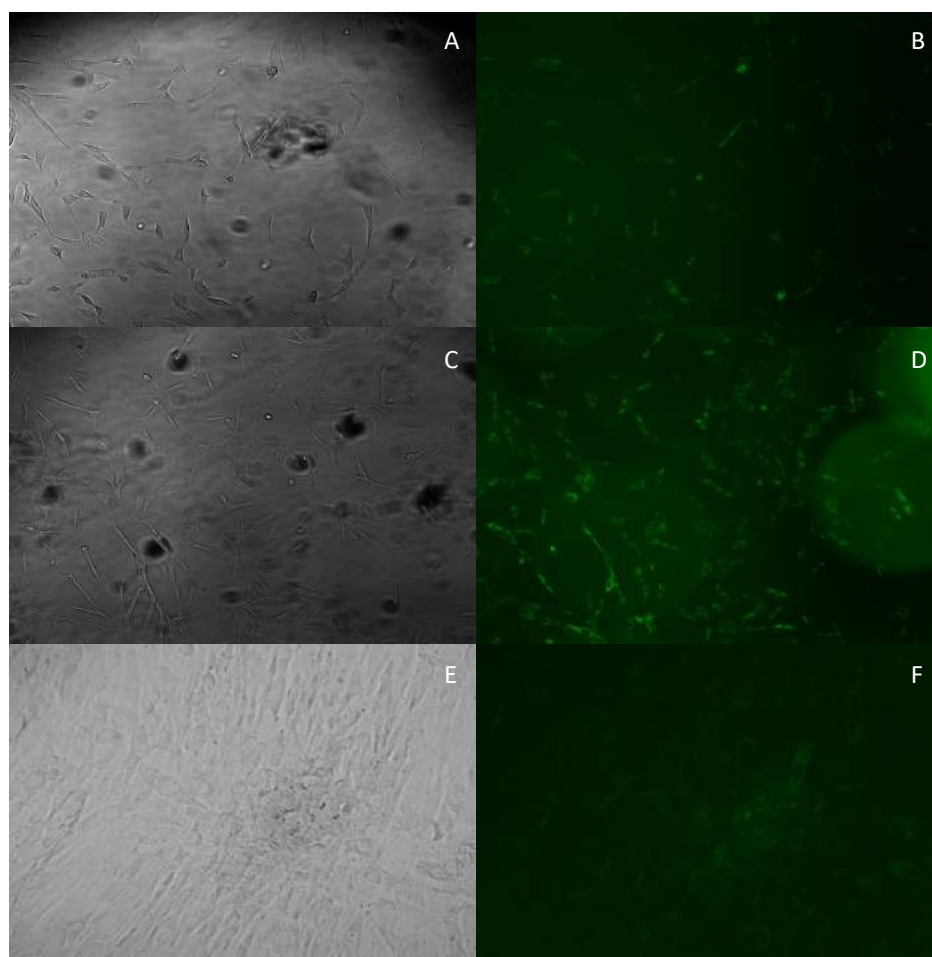


**Figura 10.** Electroforesis de los plásmidos de interés.

Se observan en los Pozos de izquierda a derecha: Marcador de peso molecular Hyperladder 1kb; pGP: (plásmido Gag-pol); pHG: (plásmido hTERT-GFP); pVG: (plásmido VSV-G)

#### 4.2.2. Evaluación de la transducción con el lentivirus hTERT-GFP.

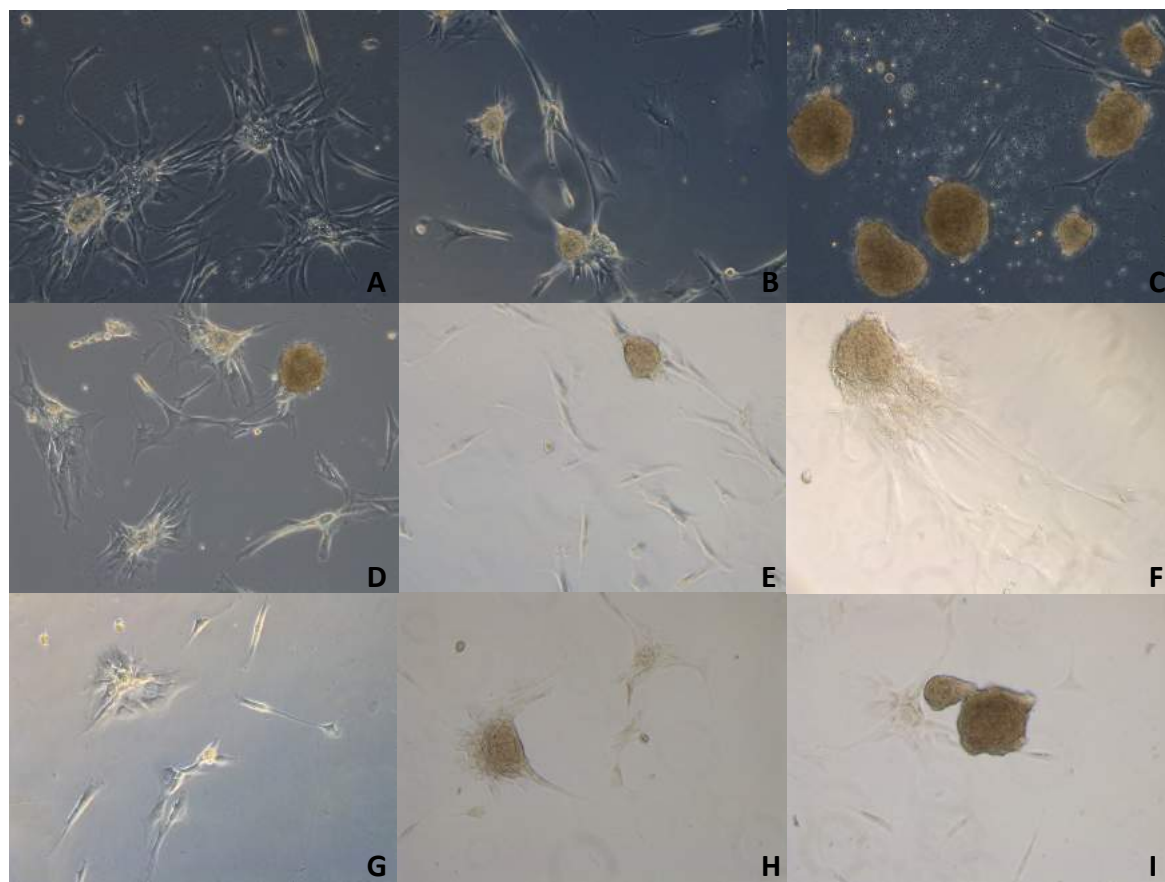
24 horas posterior a la transducción se llevó a cabo la evaluación por fluorescencia del reportero acoplado a la hTERT, GFP, observando los diferentes lotes celulares transducidos con el lentivirus que poseía el constructo hTERT-GFP expresando la proteína verde fluorescente (GFP). Se determina entonces que hubo una inserción efectiva de los genes y expresión de estos dentro de las A-MSCs (Fig. 11).



**Figura 11. Evaluación por microscopia de fluorescencia de la expresión de GFP en células transducidas.**

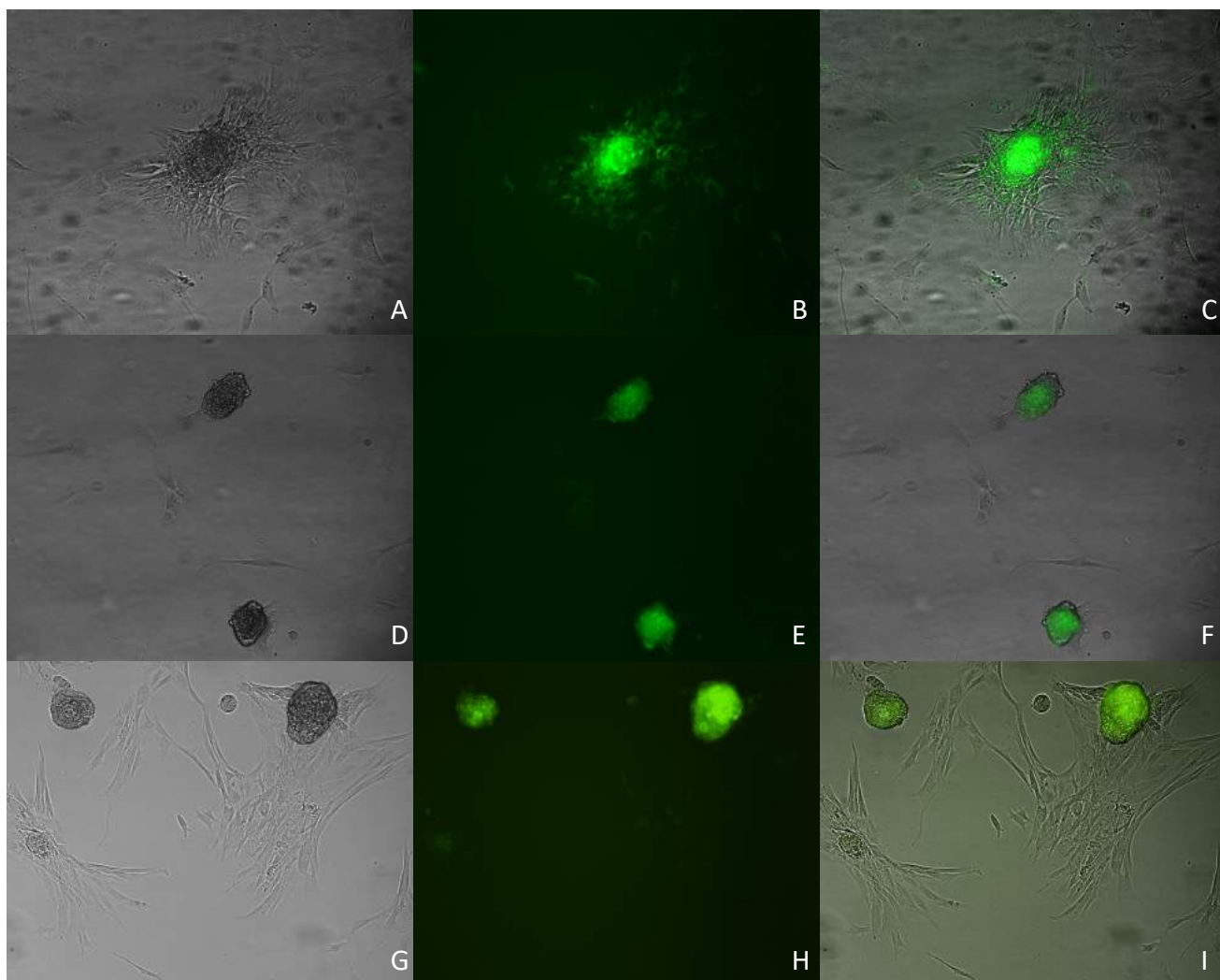
ADSEX12: Imagen obtenida por contraste de fases (A), Imagen obtenida por fluorescencia (B);  
ADSEX13: Imagen obtenida por contraste de fases (C), Imagen obtenida por fluorescencia (D);  
ADSEX15: Imagen obtenida por contraste de fases (E), Imagen obtenida por fluorescencia (F).

Se realizó el seguimiento de las células durante varios pasajes, hasta donde fue posible con cada uno de los lotes celulares transducidos. Se observó que posterior a la transducción y aun a través de los pasajes las células estas formaron esferoides por agregación celular (Fig. 12), cultivándose en las mismas condiciones habituales, los cuales presentan fluorescencia GFP+ sugiriendo que son las células transformadas las que han perdido su dependencia a la adherencia para el crecimiento y llevan a cabo estas formaciones, mientras que las células no transducidas tienen crecimiento típico en monocapa (Fig. 13).



**Figura 12. Formación de esferoides por las A-MSCs posterior a la transducción.**

ADSEX12 1 semana postinfección P1 10X (A), 1 mes postinfección P3 10X (B) 20X (C); ADSEX13 1 semana P1 (D), 1 mes P3 10X(E), 20X (F); ADSEX15 1 semana P1 10X (G), 1 mes P3 10X (H) 20X (I).



**Figura 13. Evaluación por fluorescencia de los esferoides formados por las A-MSCs transducidas.**

ADSEX12: Contraste de fases (A), Fluorescencia (B), MERGE (C); ADSEX13: Contraste de fases (D), Fluorescencia (E), MERGE (F); ADSEX15: Contraste de fases (G), Fluorescencia (H), MERGE (I).

#### **4.2.3. Selección de células GFP+ de los lotes transducidos con el constructo hTERT-GFP mediante sorting.**

Las células ADSEX12 y ADSEX13 transducidas fueron sometidas a sorting celular por citometría de flujo, logrando de esta manera la purificación de la población celular



transducida. Un 73% de la población de ADSEX12 correspondía a células GFP+, mientras en ADSEX13 tan solo un 11,8% de la población de ADSEX13 era GFP+ (Fig. 14), lo que dificultó su selección dado que la señal GFP+ era muy baja (Fig. 15).

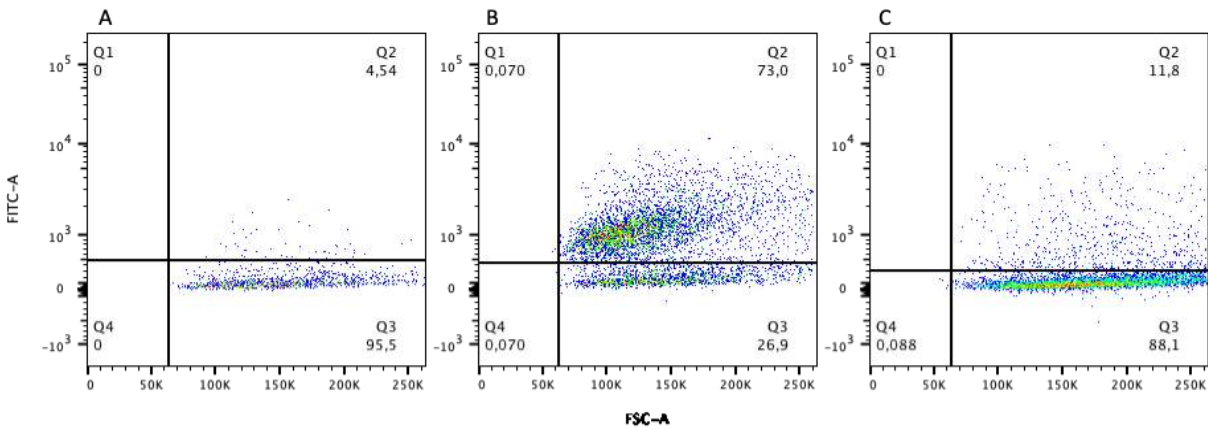


Figura 14. Selección de poblaciones GFP + de A-MSCs. A (Control) B (ADS-EX12) C (ADSEX-13)

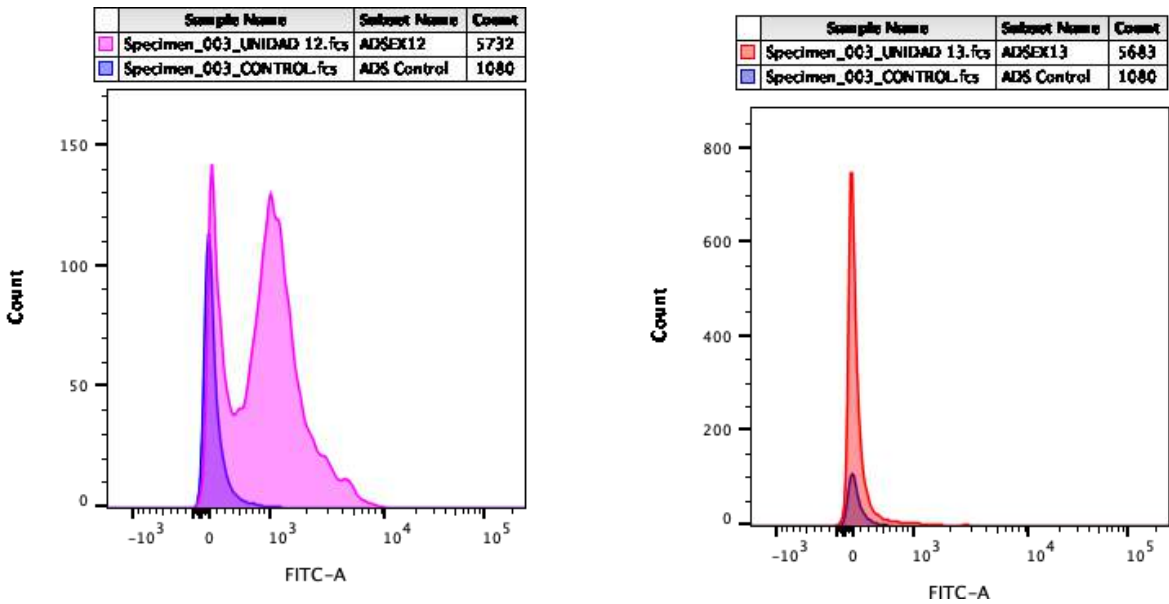
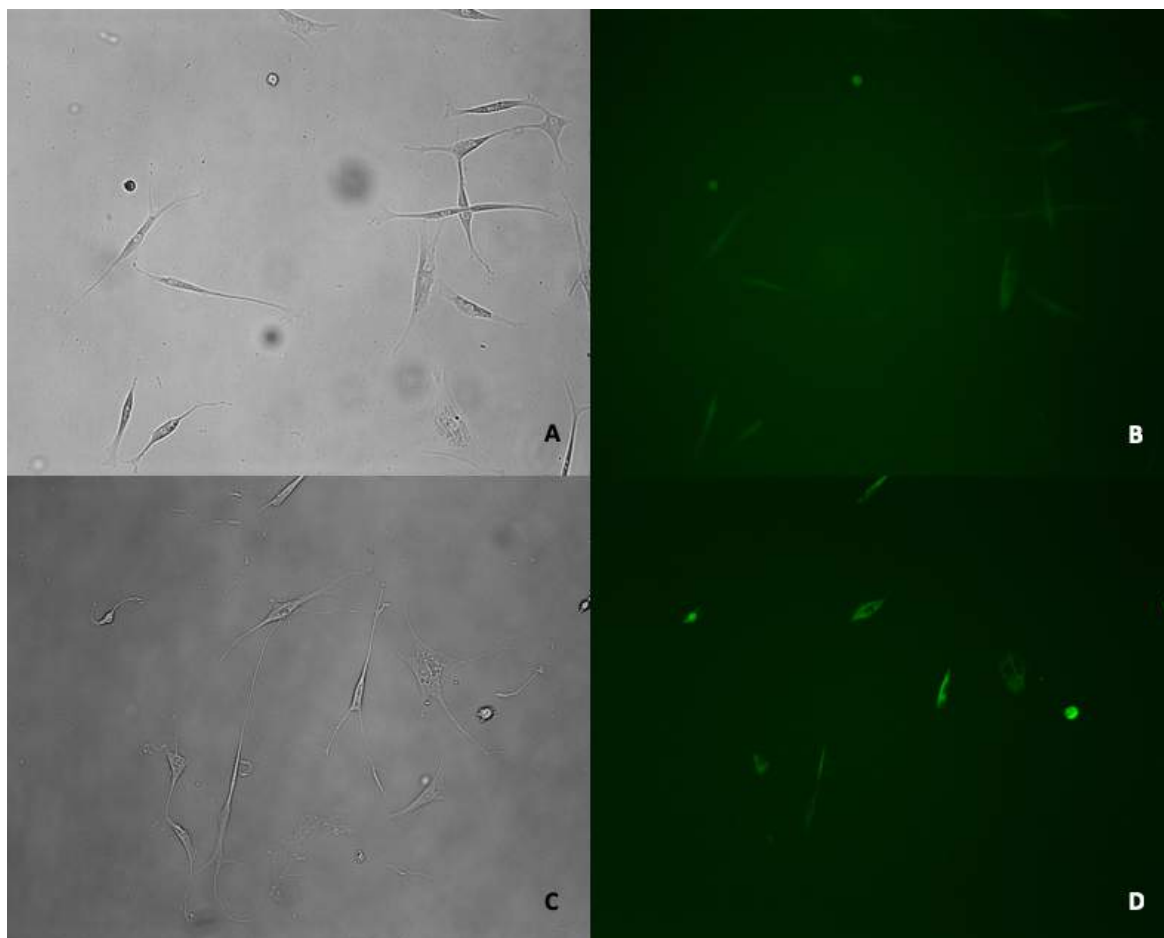


Figura 15. Caracterización por citometría del sorting celular A la izquierda ADSEX-12 y a la derecha ADSEX-13.



Sin embargo, se observa claramente como el total de la población recuperada por sorting celular corresponde a células GFP+ (Fig. 16), estableciendo de esta manera la purificación del lote celular transducido.

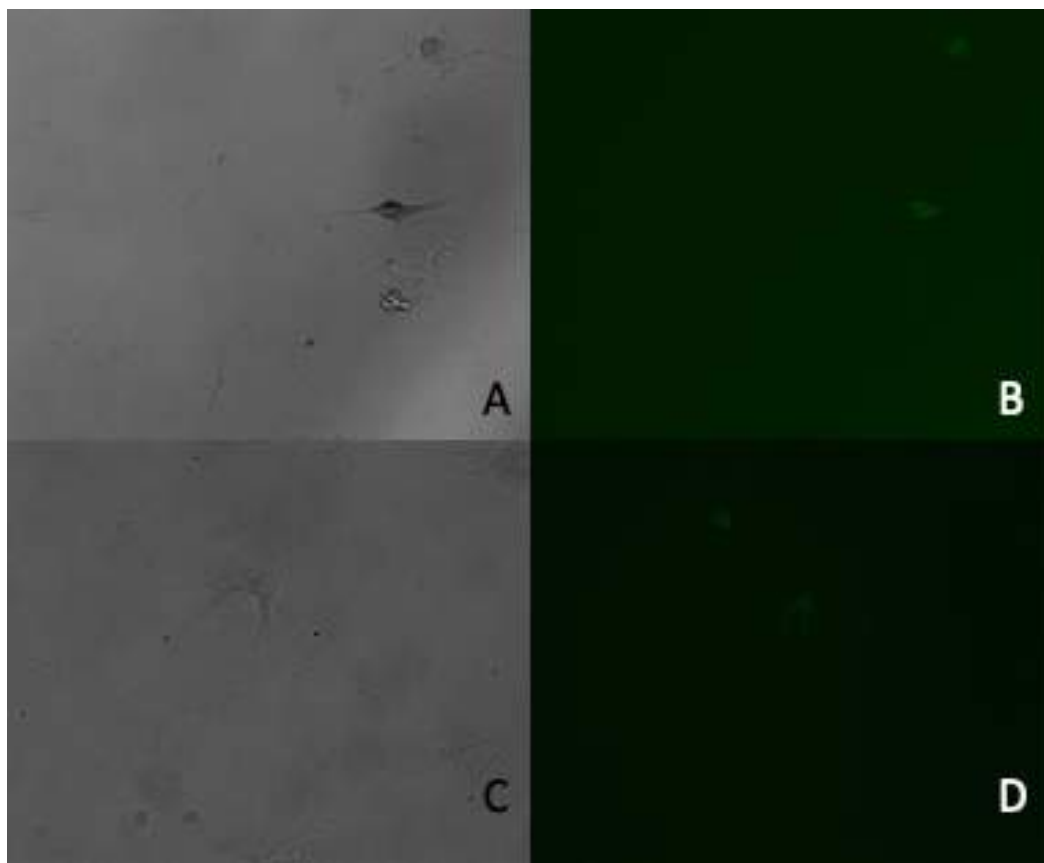


**Figura 16. Evaluación de las poblaciones seleccionadas por sorting celular para GFP+ mediante fluorescencia.**

Se observan ADSEX-12: Contraste de fases (A), Fluorescencia (B) y ADSEX-13 Contraste de fases (C), Fluorescencia (D).

El seguimiento de estas células permitió observar que al transcurso de 5 días posterior a la selección las células disminuyen la fluorescencia y entran en senescencia y posterior muerte

celular. Se observó finalmente que a las dos semanas se redujo la población celular, llevando a la pérdida total de la población celular obtenida por el sorting (Fig. 17).

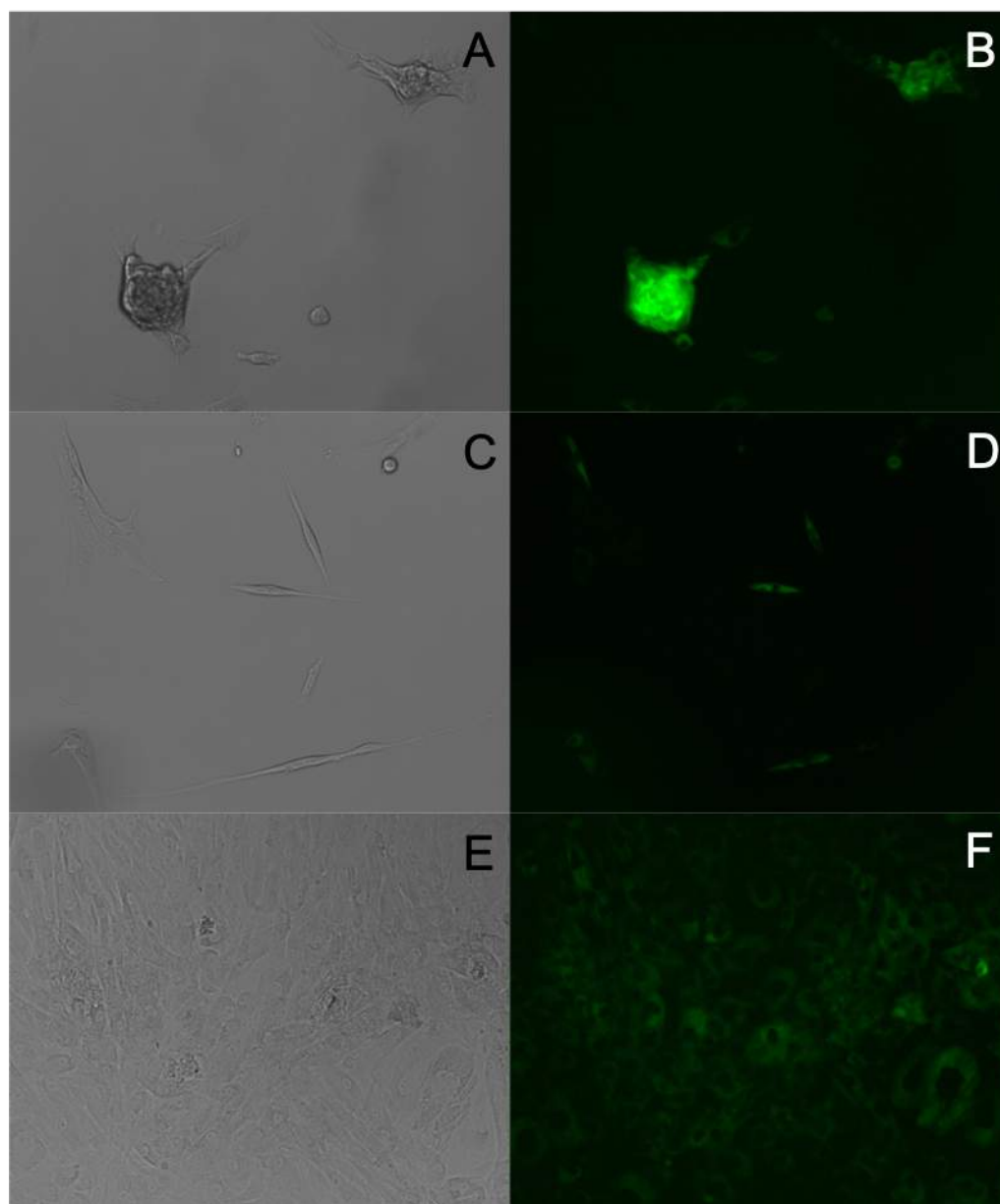


**Figura 17. Evaluación del sorting por fluorescencia GFP+, 2 semanas posterior a la selección.** Se observan ADSEX-12: Contraste de fases (A), Fluorescencia (B) y ADSEX-13: Contraste de fases (C), Fluorescencia (D).

#### **4.2.4. Evaluación de la transducción con el lentivirus hTERT-puro-GFP.**

Se realizó la transducción del lote ADSEX15 usando el lentivirus de origen comercial hTERT-puro-GFP, obteniendo una señal positiva para GFP en todas las células transducidas (Fig. 18). Sin embargo, se observó un comportamiento diferencial de las células a pesar de ser el mismo lote celular y el mismo lentivirus, cada una de las transducciones presentó un

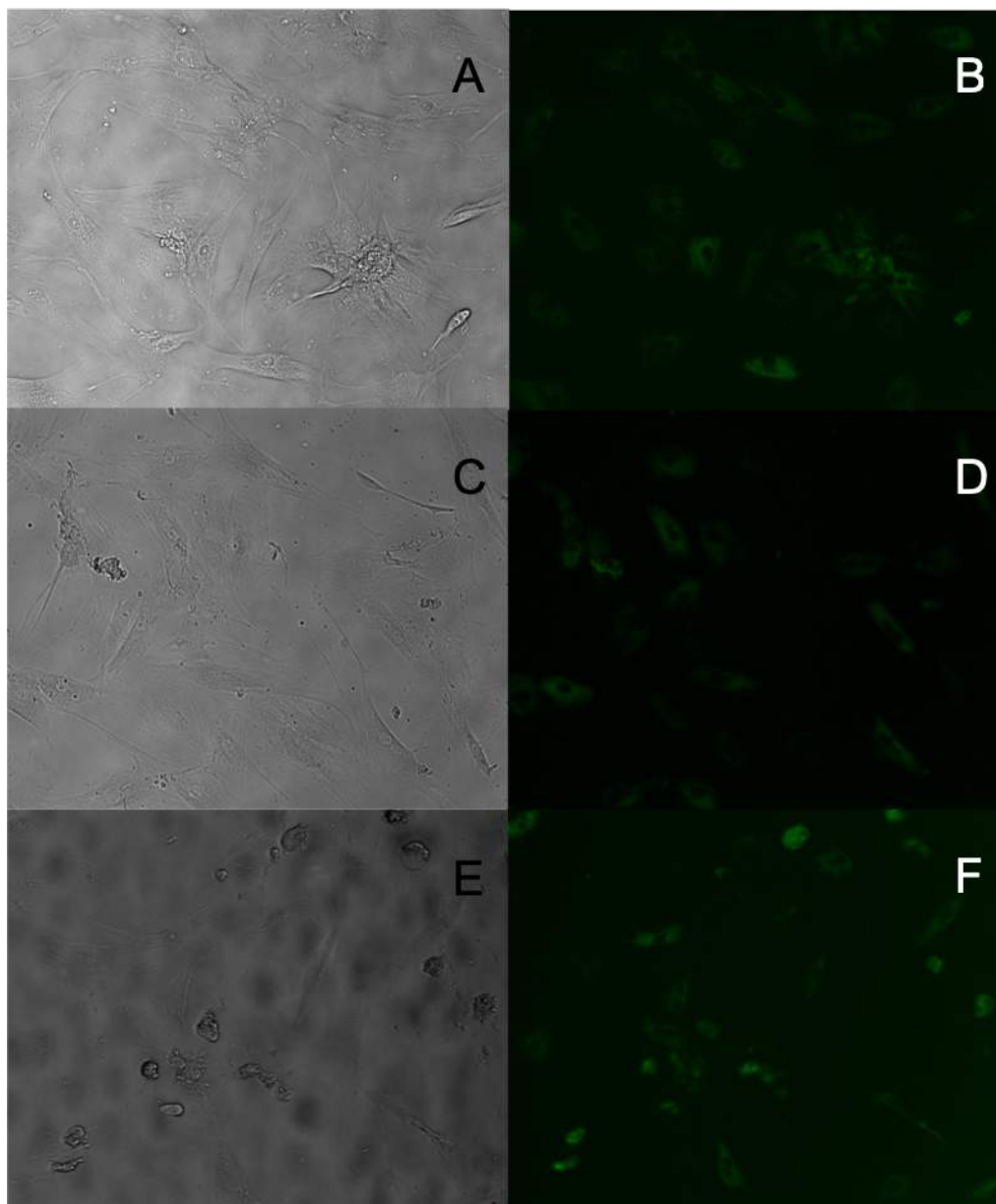
comportamiento particular, observado en la Figura 18, donde algunas de estas células llevan a cabo la formación de esferoides, otras mantienen su morfología fibroblastoide y por último otras desarrollan morfología poligonal (Fig. 18).



**Figura 18. Transducción de ADSEX15 con el lentivirus del constructo hTERT-puro-GFP**

Se observan las células de ADSEX15 24 horas posterior a la transducción con el lentivirus hTERT-puro-GFP, se observa marcación GFP positiva en todas las transducciones de la muestra. Hay variación en la morfología celular, una muestra presenta formación de esferoides (A,B), la segunda mantiene la morfología fibroblastoide típica (C,D) y la tercera muestra expansión citoplasmática y morfología más poligonal (E,F). A la izquierda se observan las imágenes de contraste de fases y a la derecha las imágenes de fluorescencia.

Se realizó la selección de células transducidas por puromicina a diferentes concentraciones dado el gen de resistencia que posee el constructo (Fig. 19).

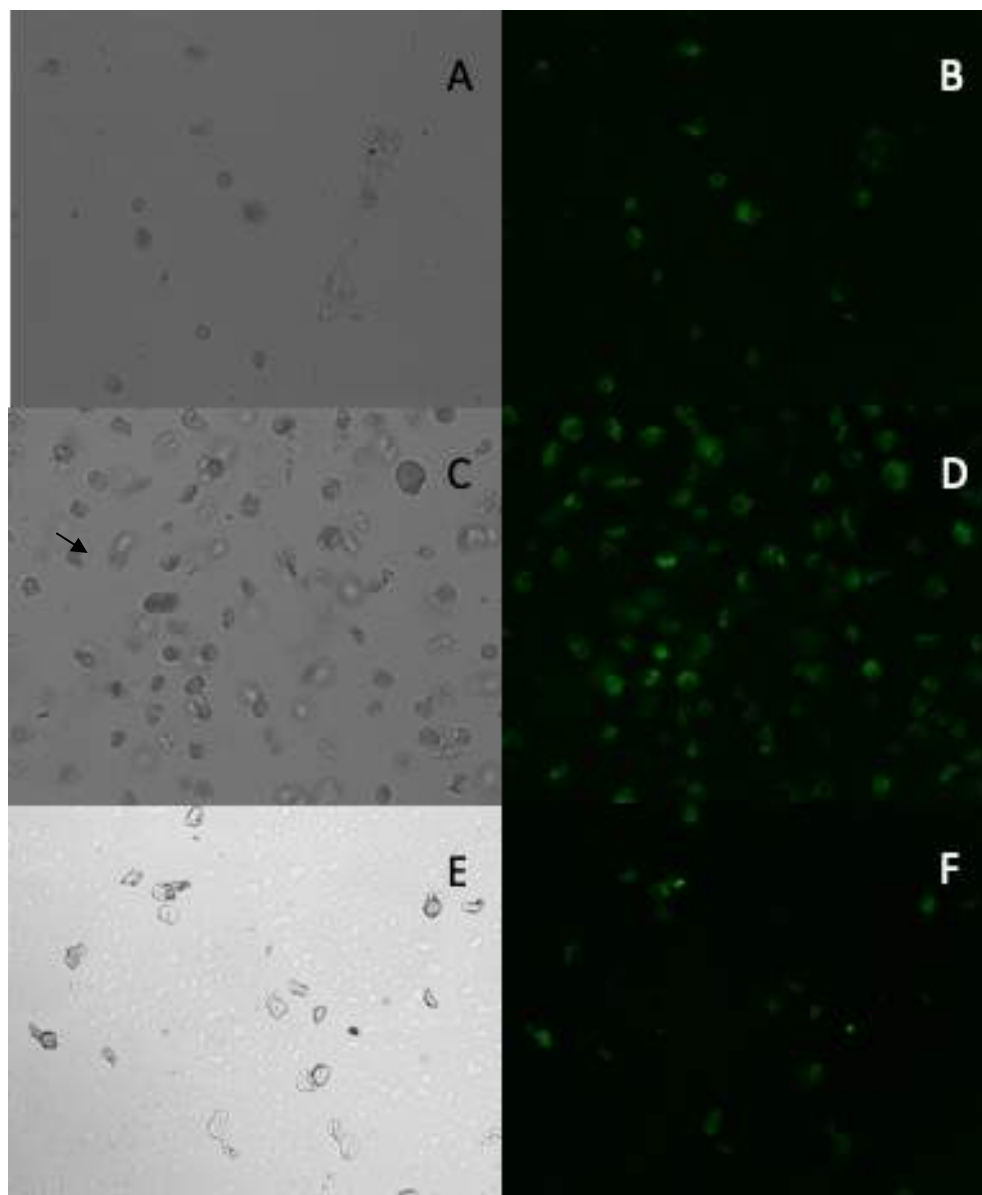


**Figura 19. Selección 24 horas por puromicina de células ADSEX15 transducidas con el constructo hTERT-puro-GFP.**

Selección a diferentes concentraciones de puromicina: 1 µg/ml (A,B), 3 µg/ml (C,D) y 5 µg/ml (E,F). A la izquierda se observan las imágenes de contraste de fases y a la derecha las imágenes de fluorescencia.

Se observaron modificaciones morfológicas en las células sometidas a selección por puromicina, tanto a las 24, 72 y 120 horas. Se puede observar entonces que bajo las tres

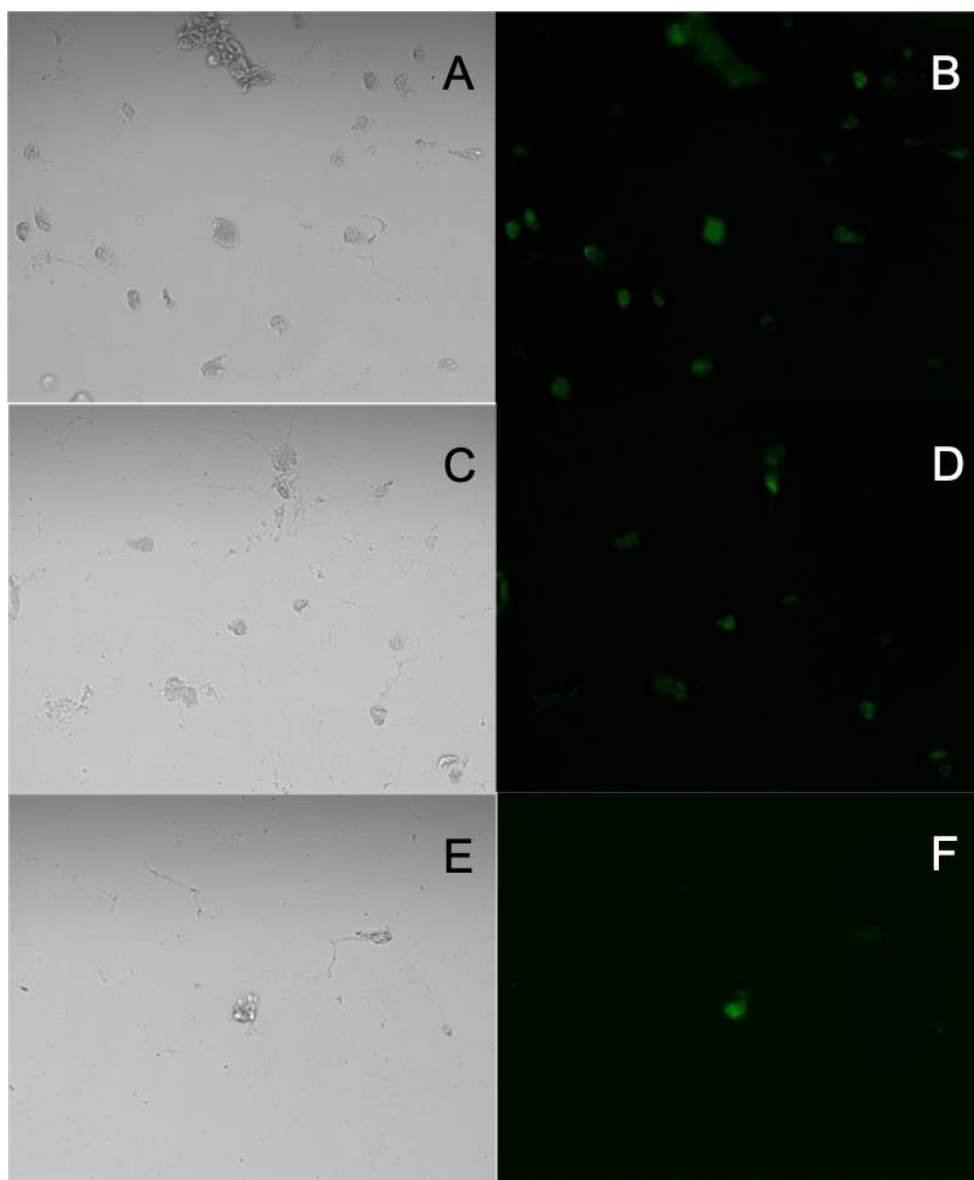
diferentes concentraciones se logra hacer la selección de células GFP+ (Fig. 19), sin embargo, se observó que las células expuestas a una mayor concentración entraron más rápido en procesos de muerte celular, mientras que las expuestas a concentraciones menores prevalecieron mayor tiempo (Fig. 20 y 21).



**Figura 20. Selección 72 horas por puromicina de células ADSEX15 transducidas con el constructo hTERT-puro-GFP.**

Selección a diferentes concentraciones de puromicina: 1 µg/ml (A,B), 3 µg/ml (C,D) y 5 µg/ml (E,F). A la izquierda se observan las imágenes por contraste de fases y a la derecha las imágenes de fluorescencia. Se observa en la selección a 3 µg/ml, que hay desprendimiento de células y por lo tanto se detectan células flotantes que igualmente son GFP+, señaladas en la imagen C.

Sin embargo, finalmente las células presentan el mismo comportamiento que las transducidas con el lentivirus hTERT-GFP, perdiendo su capacidad de replicación y llegando a muerte celular, al punto de pérdida total de la población de células transducidas (Fig. 21).

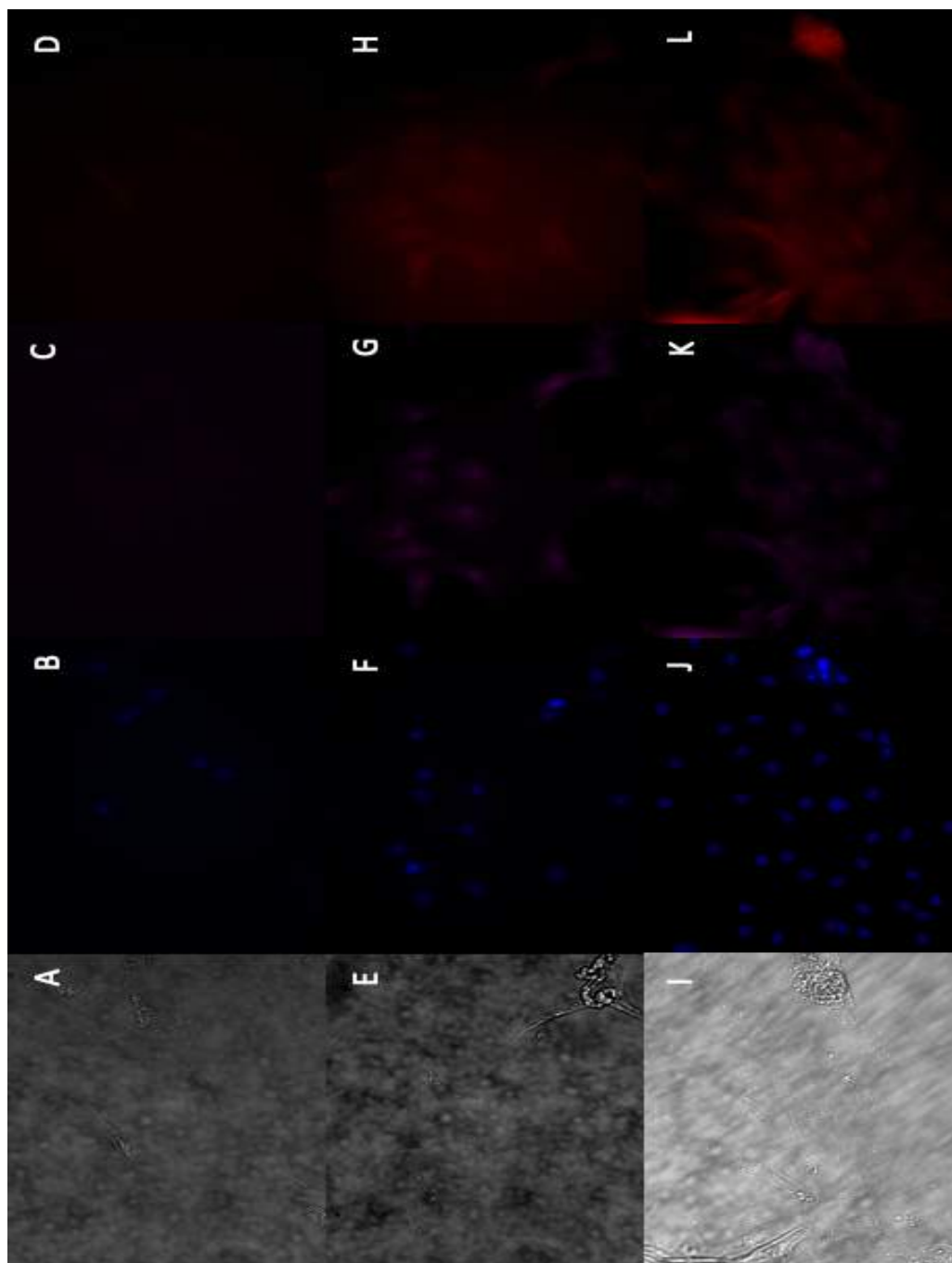


**Figura 21. Selección 120 horas por puromicina de células ADSEX15 transducidas con el constructo hTERT-puro-GFP.**

Selección a diferentes concentraciones de puromicina: 1 µg/ml (A,B), 3 µg/ml (C,D) y 5 µg/ml (E,F). A la izquierda se observan las imágenes por contraste de fases y a la derecha las imágenes de fluorescencia

#### 4.2.5. Expresión exógena de los genes.

##### 4.2.5.1. Inmunofluorescencia de hTERT y GFP.



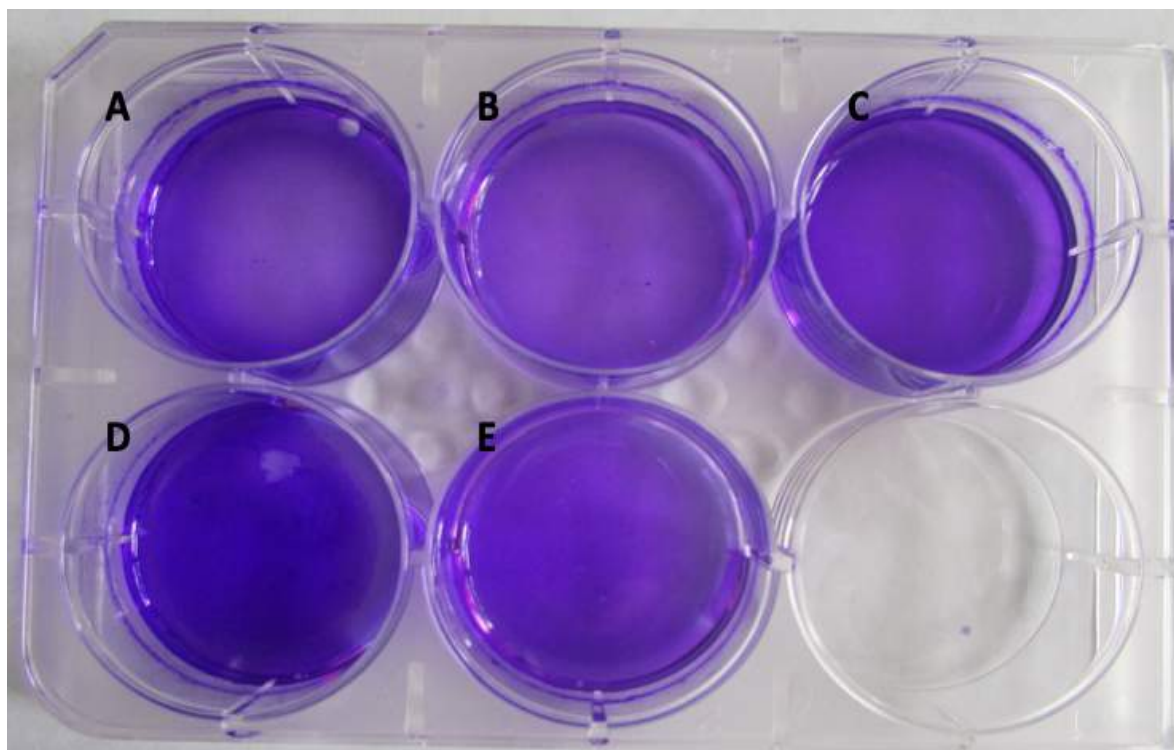
**Figura 22. Evaluación por inmunofluorescencia hTERT y GFP de ADS-EX12 y ADS-EX13**  
**ADS-EX12 no transducido:** Contraste de fases (A), DAPI (B), GFP B2 Alexa fluor 594 (C), TERT A6 Alexa fluor 647 (D) **ADS-EX12 hTERT-GFP:** Contraste de fases (E), DAPI (F), GFP B2 Alexa fluor 594 (G), TERT A6 Alexa fluor 647 (H); **ADS-EX13 hTERT-GFP :** Contraste de fases (I), DAPI (J), GFP B2 Alexa fluor 594 (K), TERT A6 Alexa fluor 647 (L).



Se observó mediante la inmunofluorescencia, la presencia de las proteínas hTERT y GFP, tanto en ADS-EX12 como en ADS-EX13. De acuerdo con lo observado la proteína hTERT se encuentra localizada en el núcleo celular lo que coincide con su función en evitar el acortamiento de los telómeros, por su parte la proteína GFP se observa localizada en citoplasma lo que coincide con su ubicación funcional de acuerdo con la literatura, lo que determina que se logró la transducción efectiva de los genes y la expresión de estos dentro de las células (Fig. 22).

### 4.3. Ensayos de Soft Agar.

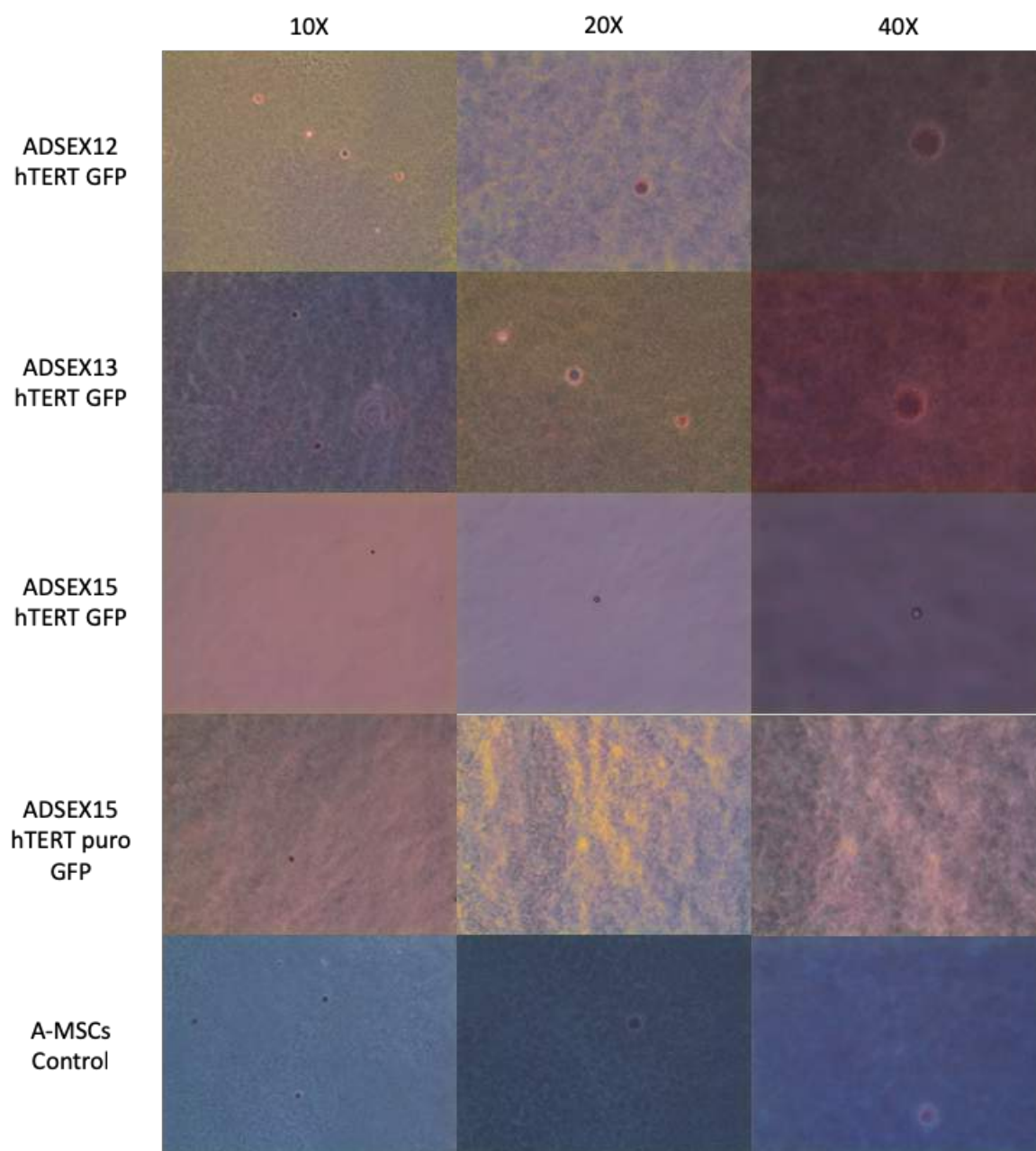
No se detectó crecimiento de colonias celulares en los ensayos de Soft Agar en ninguna de las muestras evaluadas, estableciendo que no se logró un proceso de inmortalización en las mismas (Fig. 23).



**Figura 23. Evaluación macroscópica del Ensayo de Soft Agar de las A-MSCs transducidas.** Se observa ADS EX12 hTERT GFP transducido (A), ADS EX13 hTERT GFP transducido (B), ADS EX15 hTERT GFP transducido (C), ADS EX15 hTERT-puro-GFP transducido (D), Control negativo (E).



Igualmente, se evaluó de manera microscópica cada ensayo encontrando que no había formación de colonias y que las muestras en las que aún se podían observar células se encontraban ya en procesos de muerte celular (Fig. 22).



**Figura 24. Evaluación microscópica del Ensayo de Agar de las A-MSCs transducidas.**

## 5. Discusión

Durante este trabajo se obtuvieron 6 diferentes muestras de tejido adiposo de diferentes orígenes como se puede observar en la tabla 4, durante la obtención de los lotes celulares para los procesos de transducción y evaluación, se llevó a cabo la obtención de muestras de tejido adiposo proveniente de liposucciones como se observa con la muestra ADSL4 y otras no reportadas en este trabajo ni usadas en los procesos de transducción, sin embargo aunque logramos obtener células de la muestra ADSL4, se observó que la obtención de células A-MSC bajo condiciones de cultivo Xeno-free de muestras de liposucción nos presentaron dificultades e implicaron no obtener lotes celulares en algunos casos, lo que nos llevó a determinar que en el caso de nuestras condiciones de cultivo y para la agilidad de los procesos era mejor el desarrollo de obtención de A-MSC a partir de muestras de lipectomías; es importante recalcar que la obtención de muestras presentó un reto y una de las mayores dificultades en el desarrollo de este trabajo ya que bajo las premisas de buscar pacientes entre 18 y 36 años que se sometieran a procesos estéticos como lipectomías o liposucciones que no implicaran un proceso invasivo adicional y que se encontraran sanas y tuvieran exámenes de enfermedades de transmisión sexual y otras que lo soportaran en su historia clínica, partiendo de la disposición y la necesidad de un consentimiento informado por parte del donante del tejido, fue de difícil acceso, llevando a ralentizar el proceso de obtención de las A-MSCs. Adicional es importante resaltar que, aunque se utilizaron células de los diferentes lotes que se presentan en la tabla 4, solamente fue posible completar los estudios con los lotes ADSEX12, ADSEX13 y ADSEX15, lo cual demuestra la importancia de solucionar las limitantes que establece la obtención de cultivos primarios a partir de muestras obtenidas de diferentes pacientes.

La evaluación de los marcadores de superficie típicos de MSCs y la capacidad de diferenciación multilínea de las A-MSCs es un procedimiento establecido por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT), que determina que todo lote celular debe ser caracterizado bajo las condiciones mínimas nombradas anteriormente en este documento, para poder ser utilizado en procesos de investigación, producción y aplicación en terapia celular, garantizando siempre el uso de poblaciones celulares de células madre mesenquimales, por lo tanto este proceso fue necesario en el desarrollo del proyecto y estableció uno de los puntos más importantes para continuar en el proceso de evaluación de la inmortalización celular, ya que para poder asegurar una línea de A-MSCs obtenida bajo condiciones Xeno-free es importante poder garantizar que estas células cumplen todas las condiciones para su clasificación como MSCs y adicional poder controlar todas sus características y modificaciones durante el proceso de transducción. En estudios realizados por Escobar en el 2016, se demostró la diferenciación osteogénica y adipogénica de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano en condiciones de cultivo Xeno-free, en este estudio es necesario demostrar las mismas diferenciaciones para los lotes de A-MSCs usados, pero adicionalmente se llevó a cabo la evaluación de la diferenciación condrogénica para las células cultivadas bajo estas condiciones. Dentro de los procesos de caracterización de la diferenciación condrogénica se han llevado a cabo protocolos para la evaluación de esta con el uso del cultivo de las MSCs en esferoides, sin embargo en el presente estudio se llevó a cabo la diferenciación condrogénica de las A-MSCs en cultivo de monocapa, observando que la diferenciación fue efectiva y que bajo este método también se puede obtener células diferenciadas y evaluar la presencia de matriz cartilaginosa mediante Alcian blue (Fig. 9) (Escobar, 2016; Escobar & Chaparro, 2016; Escobar Caicedo & Chaparro Garzón, 2011; Hematti et al., 2013; Jung & Nolte, 2016; I. Linero & Chaparro, 2014; Núñez Ríos et al., 2010).

Mediante las evaluaciones de la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) (Fig. 11) pudimos demostrar que la transducción con el lentivirus portando el constructo hTERT-GFP fue efectiva y por lo tanto logramos observar la presencia de GFP+ en los diferentes lotes transducidos ADSEX12, ADSEX13 y ADSEX15. Igualmente logramos obtener una transducción efectiva del lentivirus comercial hTERT-puro-GFP, donde nuestros resultados

---

demonstraron la expresión de GFP en las células transducidas del lote ADS-EX15. Estos resultados son concordantes con los diferentes estudios realizados en immortalización de células madre mesenquimales (Tabla 1; Tabla 2), en que la transducción mediante el uso de lentivirus llevo a la expresión efectiva de las células con GFP y hTERT como con otros genes transducidos.

Es importante denotar aquí que las A-MSCs cultivadas en condiciones normales, con suplementación adecuada, ya sea SFB o hPL, crecen en forma de monocapa, llegando a la confluencia total de la superficie de cultivo, pero manteniendo la dependencia a la adherencia para su crecimiento y adicional la inhibición por contacto, sin embargo, dentro de las células transducidas en este trabajo pudimos observar que adquieren comportamientos anormales en los cultivos tales como la formación de esferoides (Figs. 12; Fig. 13), estructuras que dependen de la pérdida de la inhibición por contacto y posiblemente también de la dependencia de adherencia para su formación. Según la literatura las MSCs no transducidas pueden ser capaces de generar estructuras de este tipo cuando se someten a condiciones específicas en los que se eliminan o disminuyen las superficies de adherencia y la suplementación de los medios, lo que promueve la agregación celular (Cesarz & Tamama, 2016), sin embargo las MSCs en condiciones normales de cultivo en monocapa sobre superficies adherentes no presentan la formación de esferoides celulares por agregación celular, determinando entonces que las células transducidas en este trabajo han perdido la inhibición por contacto usual de sus cultivos en monocapa, además de la disminución de la dependencia a adherencia para su crecimiento, comportamiento que concuerda con el observado en diferentes estudios de immortalización de otros tipos celulares (Buys, 2000; Eva et al., 2014; Garcia-Mesa et al., 2017; Petkov et al., 2018; Trosko, 2014).

Este comportamiento se puede relacionar con el funcionamiento de las moléculas de adhesión celular (MAC), principales encargadas de los procesos de adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular (ECM), dentro de las cuales se encuentran diferentes tipos de receptores y ligandos, principalmente glicoproteínas de tipo integrinas y cadherinas, que se han visto involucradas en procesos de migración y proliferación de las células y altamente

afectados en células de tipo cancerígeno. Se ha observado en células cancerígenas e inmortalizadas modificaciones en la expresión de genes tales como la quinasa de adhesión focal (FAK) y la proteína relacionada Tirosin quinasa 2 rica en prolina (PYK2) que son quinasas membranales de tipo no receptor que tienen funciones en la señalización de la adhesión, supervivencia y migración celular (Ali, Mutahir, & Riaz, 2019), así como modificación de genes de la familia de las proteínas F-box, las cuales funcionalmente se encuentran asociadas a los procesos de interacción proteína a proteína por ubiquitinación u otras, pero que se han encontrado relacionadas de manera importante con la progresión y desarrollo de células malignas que expresan telomerasa humana, y que podrían estar implicadas en el proceso de adhesión celular (Uddin et al., 2016), lo cual podría concordar con el comportamiento de formación de esferoides de las MSCs que está relacionado con su capacidad de adhesión y su dependencia a la adherencia para su crecimiento y proliferación. La identificación de cuál de estos mecanismos podría ser el responsable de este comportamiento en nuestras células requiere mayor investigación que se encuentra fuera del alcance de este trabajo.

Adicional se puede encontrar en la literatura la propuesta de funciones no teloméricas para la telomerasa, que aún no están claras, sin embargo, algunos estudios han establecido mediante el estudio de expresión de genes que algunas de las funciones que se ven modificados en células inmortalizadas con telomerasa puede estar relacionadas con la adhesión celular. En estudios realizados en líneas celulares U2OS de cáncer humano y VA-13 de fibroblastos inmortalizados, la sobreexpresión de telomerasa induce la modificación en la expresión de genes dentro de los cuales algunos se encuentran relacionados con la adhesión celular tal como lo indican Liu et al en 2016, sugiriendo esto nuevamente la posible explicación de los procesos relacionados con la formación de esferoides en nuestras poblaciones celulares (Auré et al., 2007a; de Punder, Heim, Wadhwa, & Entringer, 2018; Jafri, Ansari, Alqahtani, & Shay, 2016; H. Liu et al., 2016; T. M. Liu et al., 2013; Martínez & Blasco, 2011).

La inmortalización celular mediante el uso de expresión exógena de telomerasa humana ha sido ampliamente demostrada en diferentes líneas celulares; células de microglia,

---

fibroblastos, hepatocitos, entre otras han sido efectivamente transformadas e immortalizadas mediante el uso de hTERT, lo cual no es concordante con lo encontrado en este estudio, donde hallamos que las A-MSCs no se lograron immortalizar con la expresión exógena por si sola de hTERT, sin embargo, se ha establecido que cada linaje celular puede necesitar condiciones diferenciales para ser immortalizados y que algunos necesitan condiciones adicionales a la sobreexpresión de telomerasa (Bernal, Zafon, Domínguez, Bertran, & Tusell, 2018; Eva et al., 2014; Giri & Bader, 2014; H. Liu et al., 2016; T. M. Liu et al., 2013; Price & Figg, II, 2004; S. Wang et al., 2018).

En contraste con lo hallado en nuestro estudio, varios estudios de immortalización en MSCs han llevado a la immortalización y generación de líneas celulares a partir de células madre mesenquimales de diferente origen (Tabla 1), demostrando de esta manera que la expresión exógena de telomerasa humana por si sola permite la expansión de la esperanza de vida de las células y además mantiene las características tales como la capacidad de diferenciación y la expresión de marcadores de superficie típicos como CD90 y CD105. La línea celular ATCC ASC52telo se encuentra a disposición comercial en la ATCC, esta es una línea de MSCs immortalizada con hTERT y que mantiene según su estudio la capacidad proliferativa y las características típicas de las células madre mesenquimales, sin entrar en procesos de senescencia después de pasajes consecutivos, sin embargo todas estas líneas se obtuvieron bajo condiciones de cultivo con SFB, lo que establece una interferencia para su uso en desarrollo de cultivos libres de agentes xenogénicos o Xenofree, mostrando esto que lo hallado en la literatura no es concordante con lo obtenido en nuestro estudio (Abdallah et al., 2005; Böker et al., 2008; Gao et al., 2008; Honma et al., 2006; Mihara et al., 2003; Nørgaard, Kassem, & Rattan, 2006; Wolbank et al., 2011).

Por otro lado nuestro estudio es concordante con otros estudios que han sugerido y reportado que la transducción únicamente con hTERT y la sobreexpresión de esta en A-MSCs no es suficiente para immortalizar las células (Tabla 2), estableciendo que estas mantienen su proliferación y características típicas por un periodo prolongado de tiempo, pero que al cabo de 20 a 30 pasajes desarrollan senescencia y entran en secuestro del ciclo celular, ya que

encuentran resultados positivos para pruebas de  $\beta$  galactosidasa, resultado típico de células senescentes; reportando que el uso acoplado de hTERT junto con oncogenes como SV40 es capaz de generar líneas celulares a partir de MSCs de diferente origen, incluso derivadas de tejido adiposo (L Balducci & Alessandri, 2016; L Balducci et al., 2015; Luigi Balducci et al., 2014; T. M. Liu et al., 2013; Okamoto et al., 2002; Tátrai et al., 2012).

En todos los estudios de inmortalización (Tabla 1, Tabla 2), las MSCs que fueron transducidas únicamente con hTERT, aunque variaron en su establecimiento como líneas celulares, mantuvieron su proliferación normal e incluso aumentada en etapas tempranas de la transducción, llegando a pasajes 20 o superiores, lo cual no es concordante con lo observado en este trabajo, ya que vimos un efecto deletéreo de la expresión exógena de hTERT en las células transducidas que llevo al secuestro del ciclo celular y por lo tanto a la no división celular, generando de esta forma la muerte celular de todos los cultivos transducidos, sin permitir su expansión más allá del pasaje 5 de cultivo (Abdallah et al., 2018; L Balducci et al., 2015; Effros, 2007; T. M. Liu et al., 2013; Mihara et al., 2003; Okamoto et al., 2002; Qin et al., 2016; Tátrai et al., 2012; Wolbank et al., 2011).

La selección celular y purificación de las células transducidas se llevó a cabo mediante sorting con citometría de flujo, donde se logró obtener una población completamente positiva para GFP (Fig. 16). Sin embargo, estas células no perduraron en cultivo y posterior al sorting detuvieron su proliferación y entraron en proceso de muerte celular (Fig. 17). Bajo este resultado el Instituto Curie nos informó que el lentivirus producido por sus plásmidos podía tener una baja expresión de telomerasa, lo cual podría no ser suficiente para tener un efecto positivo en las células y podría explicar entonces el hecho de que las mismas entraran en procesos de senescencia. Para evaluar si era el lentivirus el responsable de estas respuestas se decidió utilizar un nuevo lentivirus de origen comercial con un promotor de tipo CMV que tiene una alta expresión y que permitiera la selección por medio de un gen de resistencia a la puromicina, sin embargo, pese a esto también se encontró que las células obtenidas con el lentivirus comercial y seleccionadas con puromicina entraron en muerte

celular igual que había sucedido con las células generadas con el lentivirus hTERT GFP y seleccionadas por sorting, llevando finalmente a la muerte celular de toda la población, lo cual sugiere entonces que el lentivirus y el nivel de expresión de hTERT no son responsables del comportamiento observado, y que es un problema intrínseco de las células.

La expresión exógena de telomerasa se ha establecido como una de las principales técnicas para la inmortalización celular debido a su función telomérica en la que evita el acortamiento de los telómeros, sin embargo, se ha encontrado que esta no está relacionada únicamente con funciones teloméricas, sino que posee otras funciones como se había dicho antes, aunque actualmente aún no se han dilucidado todas estas funciones, hay algunas sugerencias que diferentes estudios han mostrado. Adicional a las funciones relacionadas con la adhesión los estudios realizados en líneas celulares U2OS de cáncer humano y VA-13 de fibroblastos inmortalizados, Liu et al reportaron que la sobreexpresión de telomerasa humana también tenía relación con modificaciones en la expresión de genes asociados a la respuesta a diferentes estímulos, la osificación, el desarrollo celular, la morfogénesis de las células y la apoptosis, entre otras, lo cual puede sugerir entonces que al llevar a cabo una modificación en la expresión de telomerasa humana dentro de las células algunas de estas funciones biológicas, tales como la apoptosis y morfogénesis se van a ver afectadas, procesos que podrían estar relacionado con la muerte temprana de nuestras células. De forma más puntual de Punder et al en 2019, sugiere que la telomerasa está relacionada con funciones mitocondriales y teloméricas, así como un factor regulador de la expresión de genes asociados al ciclo celular; dentro de las funciones mitocondriales que se le dan a la telomerasa se haya el control de la fosforilación oxidativa, tal como lo habían propuesto Auré et al en 2006 y el control de especies reactivas de oxígeno (ROS), entre otras; igualmente se establecen funciones de regulación en la expresión genética al encontrar que la telomerasa se ve relacionada con la expresión de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y  $\beta$ -catenina, los cuales se hayan relacionados con la expresión de genes asociados a la proliferación celular, todas estas funciones podrían entonces estar explicando la alteración en la proliferación celular en nuestros lotes transducidos, explicando el porqué de la no



sobrevivencia de nuestras células hTERT-GFP ni hTERT-puro-GFP más allá de pasaje 5, sin embargo para dilucidar cuál de estos mecanismos es el responsable de este comportamiento en nuestras células se requiere de mayor investigación y experimentación, que se encuentra fuera del alcance de este trabajo (Auré et al., 2007; de Punder et al., 2018; H. Liu et al., 2016; Lu et al., 2014; Martínez & Blasco, 2011; L. Zhou, Zheng, Wang, & Cong, 2009).

Nuestros resultados indican entonces que tal como lo sugieren Liu, Balducci, Okamoto y Tátrai, se debe llevar a cabo la immortalización no solo con hTERT sino acoplando la inserción también de oncogenes relacionados con la regulación del ciclo celular, tales como Bmi1 o SV40; es importante aclarar que esta posibilidad no se había contemplado en nuestra investigación debido a los estudios existentes que determinan que la transducción con hTERT es suficiente para immortalizar y además porque al utilizar los medios condicionados de estas células cultivadas en medio Xeno-free en procesos de evaluación en medicina regenerativa con una proyección a la aplicación clínica, se debe evitar al máximo el uso de genes de tipo oncogénico o de carácter xenogénico en los cultivos, que puedan implicar riesgos para los pacientes, por lo que el uso de oncogenes implica autenticaciones y caracterizaciones más severas tanto de las células como de los medio condicionados obtenidos a partir de estas. Pese a esto, esta metodología puede mitigar algunos de los efectos de la telomerasa sugeridos por la literatura que podrían estar relacionados con su efecto deletéreo en las células, ya que al acoplar oncogenes relacionados con genes de regulación de ciclo celular, podría establecerse el secuestro de proteínas como P53 y P16 que son de vital importancia en la señalización de los procesos de senescencia y muerte celular, lo cual podría llevarnos a la obtención de líneas celulares tal como lo han realizado otros estudios expuestos anteriormente en este documento.

Es importante resaltar que la utilización de líneas celulares en la obtención de medios condicionados también presenta ciertas dificultades y desventajas, como la necesidad de llevar a cabo el establecimiento de líneas clonales, obtenidas a partir de una sola célula immortalizada, y su evaluación y comparación, igual que la necesidad de llevar a cabo

---

mejores caracterizaciones y autenticaciones en las células y los medios condicionados obtenidos, pero que igualmente implican unas ventajas superiores frente a la posibilidad de obtener medios condicionados con mayor homogeneidad, disminuir la obtención de muestras de tejido para el establecimiento de los cultivos celulares, disminuir la variación de los medios condicionados y evitar la obtención de moléculas asociadas a senescencia en los secretomas de las células, entre otros que nos permitirán un escalamiento en la producción, obtención y aplicación de los medios condicionados.

## 6. Conclusiones

A partir del desarrollo del presente trabajo y los diferentes experimentos que evalúan tanto la expresión de los genes como la transformación celular se puede concluir que, aunque se logró la transducción efectiva de las A-MSCs y la expresión exógena de hTERT en las mismas, esta no es suficiente para llevar a cabo un proceso de immortalización y la generación de líneas celulares. Adicionalmente la expresión exógena de hTERT, contrario a lo observado en otras investigaciones, presenta un efecto deletéreo en las células, acelerando el proceso de secuestro del ciclo celular y de muerte celular, por lo que se determina que el uso de hTERT como una estrategia para la formación de líneas celulares debe ir acoplado a la expresión exógena de otros genes reguladores del ciclo celular tales como SV40 o Bmi1, que puedan mitigar el efecto deletéreo de la telomerasa humana y llevar a una generación efectiva de líneas celulares.

## 7. Perspectivas y recomendaciones

### 7.1. Perspectivas

Este trabajo se establece como una fase inicial de un escalamiento en la producción de medios condicionados con fines terapéuticos en medicina regenerativa, que lleven a la utilización rutinaria de estos en el tratamiento de diferentes patologías. Los resultados aquí obtenidos nos permiten establecer nuevas vías de acción y estudio para establecer entonces líneas celulares efectivas de A-MSCs, y de esta manera hacer un primer paso en el escalamiento de la producción de medios condicionados y facilitando su uso en el estudio de muchas más patologías, llevando no solo al desarrollo de estudios preclínicos sino ya a la fase de estudios clínicos de fases de prueba.

Actualmente están en desarrollo nuevas etapas para la generación de líneas de A-MSC, donde se usa hTERT como una estrategia para la formación de líneas celulares acoplado a la expresión exógena de oncogenes reguladores del ciclo celular tales como SV40 o Bmi1, que pueden mitigar el efecto deletéreo de la telomerasa humana y llevar a una generación efectiva de líneas celulares.

La obtención de estas líneas celulares será de gran importancia al permitirnos obtener medios condicionados de mayor homogeneidad que se podrán evaluar y caracterizar adecuadamente para implementar de manera efectiva su uso en ensayos tanto preclínicos como clínicos en futuras investigaciones.

## 7.2. Recomendaciones

Se recomienda llevar a cabo estudios más profundos que involucren la determinación del efecto de la telomerasa humana en las diferentes vías descritas en la discusión de este trabajo, relacionadas con el ciclo celular y las vías de secuestro de este, para así determinar cuál puede ser la causa del efecto deletéreo hTERT sobre las células transducidas y poder tener una solución más efectiva al problema evitando el uso de oncogenes en la transducción, estudios que superan los alcances de este trabajo.

Igualmente se sugiere llevar a cabo inmortalizaciones acopladas al uso de lentivirus con genes de selección por resistencia a antibióticos por su facilidad técnica y las ventajas que puede implicar frente a aquellos que se seleccionan por sorting celular. Adicional se recomienda llevar a cabo estudios de expresión cuantitativos para evaluar el nivel de expresión exógena generado en las células transducidas y establecer su efecto en la inmortalización.

Por último se recomienda igual que en otras investigaciones acoplar el uso de hTERT con el uso de otros oncogenes relacionados con la regulación del ciclo celular para obtener líneas celulares adecuadas y que mantengan su capacidad proliferativa, además de sus características como células madre mesenquimales.

## 8. Bibliografía

- Abdallah, B. M., Haack-Sørensen, M., Burns, J. S., Elsnab, B., Jakob, F., Hokland, P., & Kassem, M. (2005). Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite of extensive proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.059>
- Abdallah, B. M., Haack-Sørensen, M., Burns, J. S., Elsnab, B., Jakob, F., Hokland, P., ... Lingner, T. (2018). Telomerase Immortalized Human Amnion- and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: Maintenance of Differentiation and Immunomodulatory Characteristics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 40(2), 131–140. <https://doi.org/10.2174/1574888X1102160107171432>
- Alcayaga-Miranda, F., Varas-Godoy, M., & Khoury, M. (2016). Harnessing the Angiogenic Potential of Stem Cell-Derived Exosomes for Vascular Regeneration. *Stem Cells International*, 2016, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/3409169>
- Ali, M., Mutahir, Z., & Riaz, A. (2019). CRISPR/Cas9 engineering of ERK5 identifies its FAK/PYK2 dependent role in adhesion-mediated cell survival. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 513(1), 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.03.145>
- Auré, K., Mamchaoui, K., Frachon, P., Butler-Browne, G. S., Lombès, A., & Mouly, V. (2007a). Impact on oxidative phosphorylation of immortalization with the telomerase gene. *Neuromuscular Disorders*, 17(5), 368–375. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2007.01.019>
- Auré, K., Mamchaoui, K., Frachon, P., Butler-Browne, G. S., Lombès, A., & Mouly, V. (2007b). Impact on oxidative phosphorylation of immortalization with the telomerase gene. *Neuromuscular Disorders*. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2007.01.019>
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. E., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (2002). *Short Protocols in Molecular Biology: A compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*. (F. Ausubel, Ed.), *Short Protocols in Molecular Biology* (Fifth Edit).

- Bajek, A., Gurtowska, N., Olkowska, J., Kazmierski, L., Maj, M., & Drewa, T. (2016). Adipose-Derived Stem Cells as a Tool in Cell-Based Therapies. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 85–92. <https://doi.org/10.1007/s00005-016-0394-x>
- Balducci, L., & Alessandri, G. (2016). Isolation, Expansion, and Immortalization of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells from Biopsies and Liposuction Specimens. In *Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (Vol. 1416, pp. 259–274). [https://doi.org/10.1007/978-1-4471-5451-8\\_113](https://doi.org/10.1007/978-1-4471-5451-8_113)
- Balducci, L., Saldarelli, M., & Alessandri, G. (2015). Immortalization of Human Adipose-Derived Stem Cells as Useful Tool to Produce Cell-Secreted Paracrine Factors for Future Applications in Cell Therapy and Regenerative Medicine Insights in Stem Cells. *Insights in Stem Cells*, 1, 1–4.
- Balducci, Luigi, Blasi, A., Saldarelli, M., Soleti, A., Pessina, A., Bonomi, A., Alessandri, G. (2014). Immortalization of human adipose-derived stromal cells : production of cell lines with high growth rate , mesenchymal marker expression and capability to secrete high levels of angiogenic factors. *Stem Cell Research & Therapy*, 5(63), 1–15. <https://doi.org/10.1186/scrt452>
- Bernal, A., Zafon, E., Domínguez, D., Bertran, E., & Tusell, L. (2018). Generation of immortalised but unstable cells after hTERT introduction in telomere-compromised and p53-deficient vHMECS. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7). <https://doi.org/10.3390/ijms19072078>
- Böker, W., Yin, Z., Drosse, I., Haasters, F., Rossmann, O., Wierer, M., Schieker, M. (2008). Introducing a single-cell-derived human mesenchymal stem cell line expressing hTERT after lentiviral gene transfer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(4), 1347–1359. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00299.x>
- Brazvan, B., Ebrahimi-Kalan, A., Velaei, K., Mehdipour, A., Aliyari serej, Z., Ebrahimi, A., Nozad Charoudeh, H. (2018). Telomerase activity and telomere on stem progeny senescence. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 102(December 2017), 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.073>
- Buys, C. H. C. M. (2000). Telomeres, Telomerase, and Cancer. *New England Journal of*

- 
- Medicine*, 342(17), 1282–1283. <https://doi.org/10.1056/NEJM200004273421710>
- Calado, R. T., & Young, N. S. (2009). Telomere diseases. *The New England Journal of Medicine*, 361(24), 2353–2365. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0903373>
- Carceller, M. C., Guillen, M. I., Ferrandiz, M. L., & Alcaraz, M. J. (2015). Paracrine in vivo inhibitory effects of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells in the early stages of the acute inflammatory response. *Cytotherapy*, 17(9), 1230–1239. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.06.001>
- Cesarz, Z., & Tamama, K. (2016). Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9176357>
- Chen, T. S., Arslan, F., Yin, Y., Tan, S. S., Lai, R. C., Boon, A., Lim, S. K. (2011). Enabling a robust scalable manufacturing process for therapeutic exosomes through oncogenic immortalization of human ESC-derived MSCs. *J Transl Med*, 1–10.
- Cho, Y. J., Song, H. S., Bhang, S., Lee, S., Kang, B. G., Lee, J. C., ... Joo, K. M. (2012). Therapeutic effects of human adipose stem cell-conditioned medium on stroke. *Journal of Neuroscience Research*, 90(9), 1794–1802. <https://doi.org/10.1002/jnr.23063>
- de Kretser, D. (2007). Totipotent, pluripotent or unipotent stem cells: a complex regulatory enigma and fascinating biology. *Journal of Law and Medicine*.
- de Punder, K., Heim, C., Wadhwa, P. D., & Entringer, S. (2018). Stress and immunosenescence: The role of telomerase. *Psychoneuroendocrinology*, 101(September 2018), 87–100. <https://doi.org/10.1016/J.PSYNEUEN.2018.10.019>
- Díaz, L., Ortiz, O., Bretón, C., Gómez, A., & Mesa, V. (2003). El ciclo celular. *MedUNAB*, 6(16), 21–29. Retrieved from [http://www.biologia.bio.br/curso/r616\\_ae\\_c1.pdf](http://www.biologia.bio.br/curso/r616_ae_c1.pdf)
- Doncel Pacheco, A., & Chaparro Garzón, O. (2010). *Comparación in vitro del efecto angiogénico de medios condicionados de células madre mesenquimales humanas obtenidas a partir de tejido adiposo y médula osea cultivadas en condiciones de normoxia e hipoxia / Adriana Doncel Pacheco ; dir., Orlando Chaparro*. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/3171/> Texto completo repositorio institucional
- Effros, R. B. (2007). Telomerase induction in T cells: a cure for aging and disease? *Exp Gerontol*, 42(5), 416–420. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2009.07.011>.Oxidized
- Eid, J. E., & Garcia, C. B. (2015). Reprogramming of mesenchymal stem cells by



- oncogenes. *Seminars in Cancer Biology*, 32, 18–31.  
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.05.005>
- Escobar, C. H. (2016). *Producción xenofre de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano y validación de su secretoma neovascularizante*. National University of Colombia. dir: Orlando Chaparro Garzón Retrieved from <http://bdigital.unal.edu.co/52951/1/carloshugoescobarsoto.2016.pdf>
- Escobar, C. H., & Chaparro, O. (2016). Xeno-Free Extraction, Culture, and Cryopreservation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Translational Medicine*, sctm.2015-0094.
- Escobar Caicedo, J. M., & Chaparro Garzón, O. (2011). *Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (hAT-MSC) marcadas mediante la expresión constitutiva de la proteína verde fluorescente (GFP) / Juan Manuel Escobar Caicedo ; dir. Orlando Chaparro Garzón [recurso electrónico]*.
- Escoffier, E., Rezza, A., de Climens, A. R., Belleville, A., Gazzolo, L., Gilson, E., & Dodon, M. D. (2005). A balanced transcription between telomerase and the telomeric DNA-binding proteins TRF1, TRF2 and Pot1 in resting, activated, HTLV-1-transformed and tax-expressing human T lymphocytes. *Retrovirology*, 2(February).  
<https://doi.org/10.1186/1742-4690-2-77>
- Eva, R., Bram, D. C., Joery, D. K., Tamara, V., & Geert, B. (2014). Europe PMC Funders Group Strategies for immortalization of primary hepatocytes, 61(4), 925–943.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.05.046.Strategies>
- Fortier, L. A. (2005). Stem cells: Classifications, controversies, and clinical applications. *Veterinary Surgery*, 34(5), 415–423. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2005.00063.x>
- Gao, K., Lu, Y. R., Wei, L. L., Lu, X. F., Li, S. F., Wan, L., Cheng, J. Q. (2008). Immortalization of Mesenchymal Stem Cells From Bone Marrow of Rhesus Monkey by Transfection With Human Telomerase Reverse Transcriptase Gene. *Transplantation Proceedings*, 40(2), 634–637.  
<https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.01.053>
- Garcia-Mesa, Y., Jay, T. R., Checkley, M. A., Luttge, B., Dobrowolski, C., Valadkhan, S., ... Alvarez-Carbonell, D. (2017). Immortalization of primary microglia: a new

- platform to study HIV regulation in the central nervous system. *Journal of NeuroVirology*, 23(1), 47–66. <https://doi.org/10.1007/s13365-016-0499-3>
- General Guidelines for Cell immortalization. (n.d.).
- Giri, S., & Bader, A. (2014). Immortalization of Human Fetal Hepatocyte by Ectopic Expression of Human Telomerase Reverse Transcriptase, Human Papilloma Virus (E7) and Simian Virus 40 Large T (SV40 T) Antigen Towards Bioartificial Liver Support. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 4(3), 191–201. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2014.08.001>
- Gorbunova, V., & Seluanov, A. (2003). Telomerase as a growth-promoting factor. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 2(6), 534–537. <https://doi.org/10.4161/cc.2.6.515>
- He, J., Cai, Y., Luo, L. M., & Liu, H. B. (2015). Hypoxic adipose mesenchymal stem cells derived conditioned medium protects myocardial infarct in rat. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19(22), 4397–4406.
- Hematti, P., Keating, A., & service), S. (Online. (2013). *Mesenchymal Stromal Cells [electronic resource] : Biology and Clinical Applications / edited by Peiman Hematti, Armand Keating*. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-5711-4>
- Henao, L. (2016). Evaluación de la capacidad de Medios Condicionados producidos por Células Madre Mesenquimales Humanas para inducir la regeneración ósea en alveolos de pacientes con exodoncia de terceros molares inferiores. Tesis de pregrado, Bogotá.
- Honma, T., Honmou, O., Iihoshi, S., Harada, K., Houkin, K., Hamada, H., & Kocsis, J. D. (2006). Intravenous infusion of immortalized human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Experimental Neurology*. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.05.004>
- Inaba, M., & Yamashita, Y. M. (2012). Asymmetric stem cell division: Precision for robustness. *Cell Stem Cell*, 11(4), 461–469. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.09.003>
- Jafri, M. A., Ansari, S. A., Alqahtani, M. H., & Shay, J. W. (2016). Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Medicine*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0324-x>
- Johal, K. S., Lees, V. C., & Reid, A. J. (2015). Adipose-derived stem cells: selecting for translational success. *Regenerative Medicine*, 10(1), 79–96.

- <https://doi.org/10.2217/rme.14.72>
- Jung, Y., & Nolta, J. A. (2016). BMI1 Regulation of Self-Renewal and Multipotency in Human Mesenchymal Stem Cells. *Curr Stem Cell Res Ther*, 11(2), 131–140. <https://doi.org/10.2174/1574888X1102160107171432>
- Kamranvar, S. A., & Masucci, M. G. (2017). Regulation of Telomere Homeostasis during Epstein-Barr virus Infection and Immortalization, 1–15. <https://doi.org/10.3390/v9080217>
- Kant, R. J., Coulombe, K. L. K., Kamranvar, S. A., Masucci, M. G., Eva, R., Bram, D. C., ... Alessandri, G. (2018). Regulation of Telomere Homeostasis during Epstein-Barr virus Infection and Immortalization. *Acta Biomaterialia*, 61(4), 925–943. <https://doi.org/10.3390/v9080217>
- Kober, J., Gugerell, A., Schmid, M., Zeyda, M., Buchberger, E., Nickl, S., ... Keck, M. (2016). Wound Healing Effect of Conditioned Media Obtained From Adipose Tissue on Human Skin Cells: A Comparative in Vitro Study. *Annals of Plastic Surgery*, 77(2), 156–163. <https://doi.org/10.1097/SAP.0000000000000358>
- Labusca, L. (2015). Scaffold Free 3D Culture of Mesenchymal Stem Cells ; Implications for Regenerative Medicine, 2(1), 1–8.
- Lee, S. C., Jeong, H. J., Lee, S. K., & Kim, S.-J. (2016). Hypoxic Conditioned Medium From Human Adipose-Derived Stem Cells Promotes Mouse Liver Regeneration Through JAK/STAT3 Signaling. *Stem Cells Translational Medicine*, 5(6), 816–825. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0191>
- Lee, W. Y. wai, & Wang, B. (2017). Cartilage repair by mesenchymal stem cells: Clinical trial update and perspectives. *Journal of Orthopaedic Translation*, 9, 76–88. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2017.03.005>
- Linero, I. (2012). *Regeneración ósea por implante de células madre mesenquimales derivadas de tejido humano adiposo en un modelo animal*. UNAL.
- Linero, I., & Chaparro, O. (2014). Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. *PLoS ONE*, 9(9), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107001>
- Linero, I. M., Doncel, A., & Chaparro, O. (2014). Proliferación y diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales en hidrogeles de plasma sanguíneo humano.

- 
- Biomédica*, 34, 67–78. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i1.1465>
- Liu, H., Liu, Q., Ge, Y., Zhao, Q., Zheng, X., & Zhao, Y. (2016). HTERT promotes cell adhesion and migration independent of telomerase activity. *Scientific Reports*, 6(February), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep22886>
- Liu, T. M., Ng, W. M., Tan, H. S., Vinitha, D., Yang, Z., Fan, J. B., ... Lim, B. (2013). Molecular Basis of Immortalization of Human Mesenchymal Stem Cells by Combination of p53 Knockdown and Human Telomerase Reverse Transcriptase Overexpression. *Stem Cells and Development*, 22(2), 268–278. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0222>
- Locke, M., Feisst, V., & Meidinger, S. (2015). From bench to bedside: use of human adipose-derived stem cells. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 8, 149. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S64373>
- Lu, W., Zhang, Y., Liu, D., Songyang, Z., & Wan, M. (2014). Telomeres - Structure, Function, and Regulation Weisi. *Experimental Cell Research*, 319(2), 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.09.005>. Telomeres
- Martínez, P., & Blasco, M. A. (2011). Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nature Reviews Cancer*, 11(3), 161–176. <https://doi.org/10.1038/nrc3025>
- Meiliana, A., Dewi, N. M., & Wijaya, A. (2017). Telomeres and Telomerase in The Aging Heart. *The Indonesian Biomedical Journal*, 9(3), 129. <https://doi.org/10.18585/inabj.v9i3.389>
- Mihara, K., Imai, C., Coustan-Smith, E., Dome, J. S., Dominici, M., Vanin, E., & Campana, D. (2003). Development and functional characterization of human bone marrow mesenchymal cells immortalized by enforced expression of telomerase. *British Journal of Haematology*, 120(5), 846–849. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04217.x>
- Nørgaard, R., Kassem, M., & Rattan, S. I. S. (2006). Heat shock-induced enhancement of osteoblastic differentiation of hTERT-immortalized mesenchymal stem cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1067(1), 443–447. <https://doi.org/10.1196/annals.1354.063>
- Núñez, D. (2010). Evaluación Del Efecto De Células Madre Mesenquimales.

- Núñez Ríos, D. L., Chaparro Garzón, O., Gómez Bello, R. M., & Muñoz, A. M. (2010). *Evaluación del efecto de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo y de medios condicionados en la recuperación motora de ratas con lesión medular / Diana Leandra Núñez Ríos ; dir., Orlando Chaparro Garzón ; codirectoras, Rosa Margarita Góme.*
- Okamoto, T., Aoyama, T., Nakayama, T., Nakamata, T., Hosaka, T., Nishijo, K., ... Toguchida, J. (2002). Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00661-7](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00661-7)
- Panchalingam, K. M., Jung, S., Rosenberg, L., & Behie, L. A. (2015). Bioprocessing strategies for the large-scale production of human mesenchymal stem cells: a review. *Stem Cell Research & Therapy*, 6(1), 225. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0228-5>
- Petkov, S., Kahland, T., Shomroni, O., & Lingner, T. (2018). Immortalization of common marmoset monkey fibroblasts by piggyBac transposition of hTERT, 1–13.
- Price, D. K., & Figg, II, W. (2004). hTert-Immortalized Endothelial Cells: An Important New Research Tool. *Cell Cycle*, 3(6), 787–787. <https://doi.org/10.4161/cc.3.6.945>
- Qin, S. Q., Kusuma, G. D., Al-sowayan, B., Pace, R. A., Isenmann, S., Pertile, M. D., ... Kalionis, B. (2016). Establishment and characterization of fetal and maternal mesenchymal stem / stromal cell lines from the human term placenta. *Placenta*, 39, 134–146. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.01.018>
- Ratajczak, M. Z. (2014). *Adult Stem Cell Therapies: Alternatives to Plasticity [electronic resource] / edited by Mariusz Z. Ratajczak*. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-1001-4>
- Rathinasabapathy, A., Bruce, E., Espejo, A., Horowitz, A., Sudhan, D. R., Nair, A., ... Katovich, M. J. (2016). Therapeutic potential of adipose stem cell-derived conditioned medium against pulmonary hypertension and lung fibrosis. *British Journal of Pharmacology*, 173(19), 2859–2879. <https://doi.org/10.1111/bph.13562>
- Rodríguez, L., Baltasar, E., & Reyes, J. (2004). El ciclo celular: características, regulación e importancia en el cáncer. *Biotecnología Aplicada*, 21, 60–69.
- Sánchez Cuervo, R. E., & Chaparro Garzón, O. (2011). *Comparación del efecto de medios condicionados de cultivos de 2 tipos de células madre mesenquimales sobre la*

- cicatrización de heridas en ratones / Rafael Eduardo Sánchez Cuervo ; dir., Orlando Chaparro Garzón [recurso electrónico]. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/3967> Texto completo repositorio institucional*
- Sart, S., Tsai, A.-C., Li, Y., & Ma, T. (2014). Three-dimensional aggregates of mesenchymal stem cells: cellular mechanisms, biological properties, and applications. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 20(5), 365–380. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2013.0537>
- Stepanenko, A. A., & Kavsan, V. M. (2012). Immortalization and malignant transformation of Eukaryotic cells. *Cytology and Genetics*, 46(2), 96–129. <https://doi.org/10.3103/S0095452712020041>
- Sun, Y., Coppé, J. P., & Lam, E. W. F. (2018). Cellular Senescence: The Sought or the Unwanted? *Trends in Molecular Medicine*, 24(10), 871–885. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.08.002>
- Tátrai, P., Szepesi, Á., Matula, Z., Szigeti, A., Buchan, G., Mádi, A., ... Németh, K. (2012). Combined introduction of Bmi-1 and hTERT immortalizes human adipose tissue-derived stromal cells with low risk of transformation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.088>
- Teixeira, F. G., Carvalho, M. M., Panchalingam, K. M., Rodrigues, A. J., Mendes-Pinheiro, B., Anjo, S., ... Salgado, A. J. (2017). Impact of the Secretome of Human Mesenchymal Stem Cells on Brain Structure and Animal Behavior in a Rat Model of Parkinson's Disease. *STEM CELLS Translational Medicine*, 6(2), 634–646. <https://doi.org/10.5966/sctm.2016-0071>
- Trosko, J. E. (2014). Induction of iPS cells and of cancer stem cells: The stem cell or reprogramming hypothesis of cancer? *Anatomical Record*, 297(1), 161–173. <https://doi.org/10.1002/ar.22793>
- Uddin, S., Bhat, A. A., Krishnankutty, R., Mir, F., Kulinski, M., & Mohammad, R. M. (2016). Involvement of F-BOX proteins in progression and development of human malignancies. *Seminars in Cancer Biology*, 36, 18–32. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.09.008>
- Uysal, C. A., Tobita, M., Hyakusoku, H., & Mizuno, H. (2012). Adipose-derived stem cells

- enhance primary tendon repair: Biomechanical and immunohistochemical evaluation. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*, 65(12), 1712–1719. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2012.06.011>
- Vats, A., Tolley, N. S., Polak, J. M., & Buttery, L. D. K. (2002). Stem cells: Sources and applications. *Clinical Otolaryngology and Allied Sciences*, 27(4), 227–232. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2273.2002.00579.x>
- Wang, J., Najjar, A., Zhang, S., Rabinovich, B., Willerson, J. T., Gelovani, J. G., & Yeh, E. T. H. (2012). Molecular imaging of mesenchymal stem cell mechanistic insight into cardiac repair after experimental myocardial infarction. *Circulation: Cardiovascular Imaging*, 5(1), 94–101. <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.111.966424>
- Wang, S., Liu, Z., Ye, Y., Li, B., Liu, T., Zhang, W., ... Chen, Z. (2018). Ectopic hTERT expression facilitates reprogramming of fibroblasts derived from patients with Werner syndrome as a WS cellular model. *Cell Death and Disease*, 9(9). <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0948-4>
- Wankhade, U. D., Shen, M., Kolhe, R., & Fulzele, S. (2016). Advances in Adipose-Derived Stem Cells Isolation, Characterization, and Application in Regenerative Tissue Engineering. *Stem Cells International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3206807>
- Weyand, B., Dominici, M., Hass, R., Jacobs, R., Kasper, C., & service), S. (Online. (2013). *Mesenchymal Stem Cells - Basics and Clinical Application I [electronic resource] / edited by Birgit Weyand, Massimo Dominici, Ralf Hass, Roland Jacobs, Cornelia Kasper*. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-35671-1>
- Wolbank, S., Ph, D., Stadler, G., Peterbauer, A., Sc, M., Katinger, H., ... Redl, H. (2011). Telomerase Immortalized Human Amnion- and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: Maintenance of Differentiation and Immunomodulatory Characteristics. *Tissue Engineering Part A*, 15(7), 1843–1854. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0205.Telomerase>
- Yu, K. R., & Kang, K. S. (2013). Aging-related genes in mesenchymal stem cells: A mini-review. *Gerontology*, 59(6), 557–563. <https://doi.org/10.1159/000353857>
- Zhou, B. R., Xu, Y., Xu, Y., Guo, S. L., Wang, Y., Zhu, F., ... Luo, D. (2013). The effect of conditioned media of Adipose-derived stem cells on wound healing after ablative fractional carbon dioxide laser resurfacing. *BioMed Research International*, 2013.

<https://doi.org/10.1155/2013/519126>

Zhou, L., Zheng, D., Wang, M., & Cong, Y. S. (2009). Telomerase reverse transcriptase activates the expression of vascular endothelial growth factor independent of telomerase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 386(4), 739–743. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.06.116>



## **A. Anexo: Consentimiento informado utilizado en el proyecto.**

### **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Respetado(a) señor(a):

Por medio de la presente queremos invitarlo(a) a donar el tejido adiposo sobrante que será eliminado como desecho anatomopatológico producto de liposucción, lipectomía o de biopsias incisionales, que le serán practicadas por su médico tratante. El tejido donado se empleará en investigaciones sobre células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo lideradas por el Grupo de Investigación Biología de Células Madre (GIBCM) de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia (UNAL), sede Bogotá.

El tejido adiposo blanco depositado en nuestro cuerpo, especialmente en el abdomen y los muslos, contiene un número limitado de células madre mesenquimales con potencial para multiplicarse, diferenciarse y producir múltiples sustancias estimulantes del crecimiento celular que pueden reparar tejidos lesionados por trauma o enfermedad.

Este efecto benéfico ha sido evidenciado en estudios previos, tanto en animales como en humanos, desarrollados por diferentes grupos de investigación internacionales y nacionales, donde el cultivo y posterior aplicación de las células madre mesenquimales o de las sustancias químicas que secretan al medio extracelular, mejora la cicatrización de heridas cutáneas y quemaduras, promueve el cierre de fistulas, la reparación ósea y la regulación de la inflamación.

Las células madre mesenquimales son una herramienta novedosa de la medicina regenerativa y la bioingeniería de tejidos, razón por la cual, actualmente cursan más de 600 estudios clínicos a nivel mundial con el objetivo de demostrar su potencial para el tratamiento de lesiones medulares por trauma y enfermedades autoinmunes, osteomusculares, hepáticas, cardíacas, pulmonares, osteomusculares, neurodegenerativas y algunos tipos de cáncer.

Las células madre mesenquimales obtenidas del tejido adiposo pueden ser transducidas para evitar la senescencia y la muerte celular que se producen normalmente durante el cultivo de las células. Esta intervención se realiza con el fin de mantener un stock de células congeladas con las propiedades necesarias para la investigación durante largos periodos de tiempo.

Dado que las investigaciones en este nuevo campo durarán años, su participación beneficiará en el futuro a pacientes con traumas o enfermedades que puedan ser tratadas con las células madre mesenquimales o los productos que secretan, pero puede que usted no se beneficie de los resultados.

Ser donante de tejido adiposo no acarreará intervenciones ni gastos adicionales a la realización de su liposucción, lipectomía u otro tipo de intervención quirúrgica programada y la toma de la muestra no tienen riesgos adicionales a los ya relacionados con su cirugía.

Se garantiza que la información clínica suministrada, así como la obtenida en un futuro como producto del análisis de sus muestras, será de carácter confidencial y tratada en consecuencia. Para contribuir al anonimato de su identidad, su muestra será identificada con un código y no con su nombre. La relación entre el código y su identidad quedará custodiada por el líder del grupo de investigación o su colaborador autorizado, adoptándose medidas para que tal información no esté disponible a terceros.

### **AUTORIZACIÓN PARA PARTICIPAR EN LA INVESTIGACIÓN**

Entiendo que no obtendré ningún beneficio económico por donar tejido adiposo para la realización de investigaciones de células madre mesenquimales humanas y que los resultados de estos trabajos serán utilizados con fines científicos - académicos.

He leído la información detallada en este formulario de consentimiento informado y todas mis preguntas concernientes al empleo del tejido adiposo para la obtención de células madre mesenquimales, así como el proceso de cultivo, immortalización y obtención de medios condicionados (medio de cultivo con las sustancias producidas por las células madre); me fueron completa y satisfactoriamente contestadas por mi médico tratante o un integrante del grupo de investigación GIBCM de la UNAL

Entiendo que puedo rehusarme a donar el tejido adiposo sin otorgar ninguna explicación y que puedo revocar mi consentimiento y solicitar la eliminación de las células criopreservadas (congeladas), sin que mi cuidado, atención por parte de mi médico tratante o derechos legales se vean afectados.

Entiendo que, si decido ser donante, recibiré una copia firmada de este formulario de consentimiento informado, la cual será anexada a mi historia clínica.

A continuación, expreso mi voluntad con respecto a la donación del tejido adiposo:

SI	NO	Acepto ser donante de tejido adiposo sobrante y que será eliminado como desecho anatomopatológico producto de liposucción, lipectomía o de biopsias incisionales, que me serán practicadas por mi médico tratante.
SI	NO	Acepto que el grupo GIBCM, utilice mi información clínica, las muestras y las células obtenidas de ellas para investigaciones biomédicas.
SI	NO	Acepto que las células madre mesenquimales obtenidas del tejido adiposo que he donado, sean immortalizadas y criopreservadas (congeladas) por el grupo GIBCM con fines científicos-académicos sin limitaciones de tiempo.

**Nombre del Donante** \_\_\_\_\_

**Firma** \_\_\_\_\_

**Fecha** \_\_\_\_\_

**Nombre del Investigador** \_\_\_\_\_

**Firma** \_\_\_\_\_

**Fecha****Testigo 1****Firma****Fecha****Testigo 2****Firma****Si el participante no sabe firmar:**

Huella del voluntario



Persona designada por el sujeto de investigación:

**Nombre****Firma****Fecha****REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Yo \_\_\_\_\_ identificado con  
\_\_\_\_\_ número \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ con domicilio en  
\_\_\_\_\_ revoco el  
consentimiento de donación de tejido adiposo, no deseando proseguir la donación voluntaria, que  
doy a esta fecha por finalizada.

**Nombre del donante****Firma****Fecha**